

# Request Form for Translation

Translation Branch  
The world of foreign prior art to you.  
Translations

U. S. Serial No. : 09/355 210

Requester's Name:

DAVID LUKTON

Phone No. :

703.308.3213

Fax No. :

Office Location:

9 B 05

Art Unit/Org. :

1653

Group Director:

KISLICK

Is this for Board of Patent Appeals?

NO

Date of Request:

12/9/02

Date Needed By:

Prefer by 12/31/02

(Please do not write ASAP-indicate a specific date)

PTO-2003-1018

SPE Signature Required for RUSH:

## Document Identification (Select One):

\*\*(Note: Please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form)\*\*

1. ☒ Patent

Document No. 06.172385

Language JAPANESE

Country Code JP

Publication Date 6-21-94

No. of Pages \_\_\_\_\_

(filled by STIC)

2. ☐ Article

Author \_\_\_\_\_

Language \_\_\_\_\_

Country \_\_\_\_\_

3. ☐ Other

Type of Document \_\_\_\_\_

Country \_\_\_\_\_

Language \_\_\_\_\_

## Document Delivery (Select Preference):

☐ Delivery to Exmr. Office/Mailbox Date: 12.18.02 (STIC Only)

☐ Call for Pick-up Date: \_\_\_\_\_ (STIC Only)

E-mailed 12.18.02

## STIC USE ONLY

KLT

### Copy/Search

Processor: 11

Date assigned: 12.10

Date filled: 12.10

Equivalent found: \_\_\_\_\_ (Yes/No)

Doc. No.: \_\_\_\_\_

Country: \_\_\_\_\_

Remarks: \_\_\_\_\_

### Translation

Date logged in: 12.10.02

PTO estimated words: 6015

Number of pages: 38

In-House Translation Available: \_\_\_\_\_

In-House: \_\_\_\_\_

Translator: \_\_\_\_\_

Assigned: \_\_\_\_\_

Returned: \_\_\_\_\_

Contractor: DCW

Name: \_\_\_\_\_

Priority: 12.12.02

Sent: 12.12.02

Returned: 12.12.02

Phone: 308-0881  
Fax: 308-0989  
Location: Crystal Plaza 3/4  
Room 2C01

To assist us in providing the most cost effective service, please answer these questions:

Will you accept an English Language Equivalent?  
\_\_\_\_\_ (Yes/No)

Will you accept an English abstract?  
\_\_\_\_\_ (Yes/No)

Would you like a consultation with a translator to review the document prior to having a complete written translation?  
\_\_\_\_\_ (Yes/No)

Check here if Machine Translation is not acceptable:  
(It is the default for Japanese Patents, '93 and onwards with avg. 5 day turnaround after receipt)

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-172385

(43)公開日 平成6年(1994)6月21日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 5/12		8318-4H		
A 6 1 K 37/02	A E D	8314-4C		
C 0 7 K 5/08		8318-4H		
C 1 2 P 21/02	Z N A A	8214-4B		
// C 1 2 N 9/99				

審査請求 未請求 請求項の数3(全14頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-351725

(22)出願日 平成4年(1992)12月8日

(71)出願人 000006677

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(72)発明者 寺村 恭子

東京都板橋区小豆沢4-11-11 ジョイフ

ファースト205号

(72)発明者 安室 憲一

埼玉県浦和市大谷場1-4-30

(72)発明者 鈴木 康人

東京都台東区柳橋1-12-5

(74)代理人 弁理士 長井 省三 (外1名)

最終頁に続く

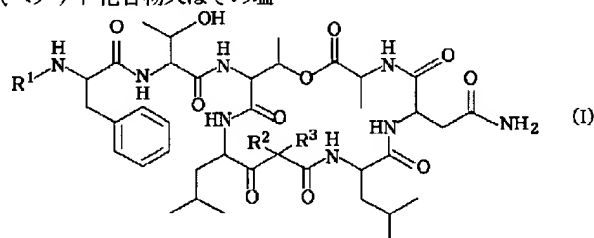
(54)【発明の名称】 新規な環状ペプチド化合物及びその製造法

(57)【要約】

又はこれらの製造法。

【構成】 下記的一般式(I)又は式(II)からなる群から選択される一の新規環状ペプチド化合物又はその塩

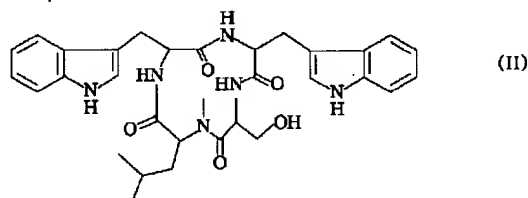
【化1】



(式中の各記号は、下記の意味を有する。)

R<sup>1</sup>: ベンジルカルボニル基又はイソバレリル基R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>: 夫々水酸基, 又は一体となってカルボニル酸素)

【化2】

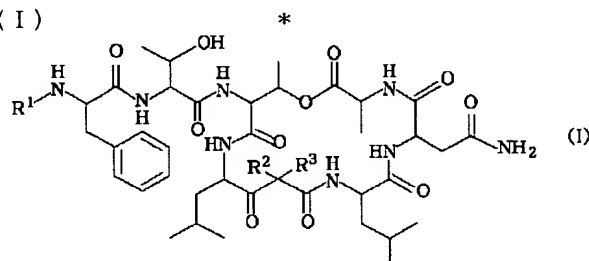


【効果】 医薬, 特にエラスターゼ阻害剤として, 肺気腫等に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(I)

\*【化1】

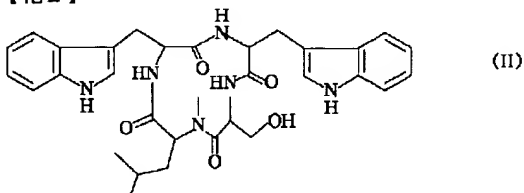


(式中の各記号は、下記の意味を有する。)

R<sup>1</sup> : ベンジルカルボニル基又はイソバレリル基R<sup>2</sup> , R<sup>3</sup> : 夫々水酸基、又は一体となってカルボニル酸素)

又は下式(II)

【化2】



からなる群より選択される一の新規環状ペプチド化合物又はその塩。

【請求項2】 フレキシバクター (Flexibacter) 属に属し、請求項1に記載の新規環状ペプチド化合物を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に生成蓄積した新規環状ペプチド化合物を採取することを特徴とする該新規環状ペプチド化合物の製造法。

【請求項3】 フレキシバクター (Flexibacter) 属に属する微生物が、フレキシバクター エスピー (Flexibacter sp.) Q17897 (微工研菌寄第13305号) である請求項2記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は医薬、殊にヒト白血球由来のエラスターゼ阻害物質として有用な環状ペプチド化合物及び発酵法による該阻害物質の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒト白血球由来のエラスターゼは、肺疾患〔特に肺気腫及び呼吸窮迫症候群 (ARDS) 〕やリウマチ様関節炎等の炎症に関連する結合組織破壊に寄与していることが既に知られている。エラスターゼは、結合組織の主要な構成成分の一つであるエラスチンの特異的に分解する酵素である。エラスターゼの活性調節には、ヒト血清中に存在する糖タンパク質であり、エラスターゼの天然阻害物質の一つである $\alpha_1$ -アンチトリプシンの関与が大きいと考えられている。遺伝的要因又は生体内過酸化物質の影響による血清 $\alpha_1$ -アンチトリプシン量の著明な減少は、エラスターゼ過剰状態を引き起こし、エラスチンの分解に伴う結合組織破壊が亢進する※50

10※結果として上記疾患が発現するものと想定されている。

エラスターゼ阻害剤は、このようなエラスターゼによるエラスチンの分解を抑制することにより、結合組織破壊を抑えることができると考えられる。従って、エラスターゼ阻害剤は、エラスチンが分解されることによって引き起こされると考えられる肺疾患(特に肺気腫及びARDS)やリウマチ様関節炎、気管支、骨関節炎、脊椎炎、狼瘡、乾癬等のような炎症症状の治療又は予防に有用である。

【0003】従来、天然のエラスターゼ阻害作用を有する物質としては、ペプチドタイプと非ペプチドタイプのものが知られている。これらの内、特に本発明に関連するペプチドタイプの阻害物質としては、WO90/12805に記載のエラスチナールや特開平3-218387に記載のWS7622Aが挙げられる。なお、WS7622Aは前記公報には化学構造は開示されていないが、そのスルホネートの部分構造を開示した欧州特許第465895号公報の記載によれば、非環状ペプチドタイプの物質である。

【0004】

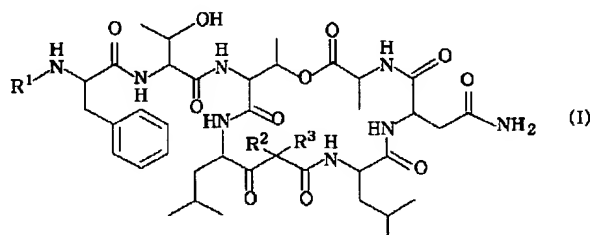
【発明が解決しようとする課題】このような状況の中で、本発明者らは天然に存在する多くの微生物が生産する物質について研究を行っていたところ、フレキシバクター属に属する新菌種を培養する事によって、培地中に優れたエラスターゼ阻害作用を示し、上記阻害物質とは化学構造を異にする環状ペプチド構造を有する新規物質が生産されることを見出し、更にこの物質を単離することにより本発明を完成した。従って、本発明の目的は新規エラスターゼ阻害物質を提供することにある。また、本発明の別の目的はフレキシバクター属に属する微生物を用いる発酵法により製造する事を特徴とする、エラスターゼ阻害物質の製造法を提供することにある。更に本発明の目的は、フレキシバクター属に属する新規微生物を提供することにある。本発明の更にもう一つの目的は、本発明化合物(I)、(II)またはそれらの塩を含有する医薬組成物を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は下記一般式(I)又は式(II)で示される新規な環状ペプチド化合物又はその塩に関する。

【0006】

## 【化3】



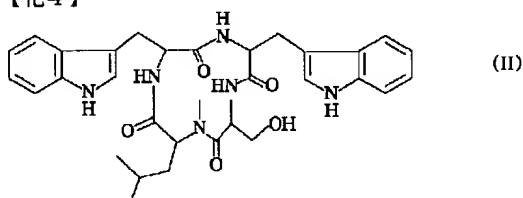
【0007】(式中の各記号は、下記の意味を有する。

R<sup>1</sup> : ベンジルカルボニル基又はイソバレリル基

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> : 夫々水酸基、又は一体となってカルボニル酸素)

【0008】

## 【化4】



【0009】本発明化合物(I)又は(II)は、酸付加塩を形成する場合がある。また、塩基との塩を形成する場合もある。かかる塩としては、具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の鉱酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸等の有機酸、アスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸との酸付加塩、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウムなど無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミンなどの有機塩基、リジン、オルニチンなどの塩基性アミノ酸との塩やアンモニウム塩等が挙げられる。また、本発明化合物は不斉炭素原子を有しており、光学異性体が存在する。本発明の目的化合物には、これら光学異性体の単離されたもの及びその混合物が含まれる。さらに、本発明化合物は水和物又はメタノール、エタノール等との溶媒和物を形成することもある。本発明の目的化合物にはこれらのものも含まれる。

【0010】本発明の製造法は、フレキシバクター属に属する新規環状ペプチド化合物を生産する能力を有する\*

\* 微生物を培養し、培地中に生成蓄積させ行うことができる。また、本発明の製造法は、上記の新規生理活性物質(新規目的化合物)を生産する能力を有す微生物を培養し、培地中に該化合物を生産させ、次いで該化合物を採取することからなる新規環状ペプチド化合物の製造法である。本発明の新規環状ペプチド化合物を生産する菌株は次のような菌学的性状を有する。

【0011】[フレキシバクター エスピー (Flexibacter sp.) Q17897株の微生物学的性質] 本菌株は沖縄県、座間味島より採取された土壌より分離された細菌で上記の菌株番号を付与された。

## 20 【0012】1) 形態

肉汁寒天培地上で、33℃、5日間培養した細菌は0.2~0.4×0.4~15μmの桿菌で、孢子を形成せず運動性はない。グラム染色性は陰性である。また、以下に示す組成の培地(グルタミン酸ナトリウム0.5%、イーストエキストラクト(DIFCO LABORATORIES 社製)0.1%、硫酸マグネシウム0.1%、グルコース0.2%、寒天1.5%、pH7.2)上で50μm以上の長い細胞が観察される。

## 【0013】2) 各種培地における生育の性状

① 普通寒天培地上では、オレンジ色で周縁部の盛り上がった形状のコロニーが観察され、滑走性が認められる。

② ハート・インフュージョン液体培地で培養24時間後に培地上部が濁るのが観察され、培養5日後には培地全体が濁り皮膜も観察される。

③ リトマスミルクで培地では2日目頃からペプトン化が始まり培地が酸性となるが、凝固は認められない。

## 【0014】3) 生理的性質

## 【0015】

## 【表1】

VPテスト	: 陰性
インドールの生成	: 陰性
硫化水素の生成	: 陰性
クエン酸の利用性 (シモンズ培地)	: 陰性
硝酸ナトリウムの利用性	: 陰性
ゼラチンの液化	: 陽性
オルニチン脱炭酸	: 弱陽性
リジン脱炭酸	: 陰性
オキシダーゼ	: 陰性
カタラーゼ	: 陽性
ウレアーゼ	: 陰性
DNaseの生成	: 陰性
IPA	: 陰性
OFテスト	: O型
脱脂牛乳の凝固	: 陰性
脱脂牛乳のペプトン化	: 陽性
NaCl添加培地での生育	: 2%で生育するが 3%以上で生育しない
栄養要求性	: なし
生育温度範囲	: 15~37℃
至適生育温度範囲	: 27~32℃
生育pH範囲	: 5~9
至適生育pH範囲	: 7~8
色素の生成	: 陽性
嫌気培養	: 陽性

【0016】4) 炭素源の利用性  
【0017】

40\*【表2】

\*

	糖の利用性	酸の生成
L-アラビノース	±	NT
D-キシロース	-	-
D-グルコース	+	+
D-フラクトース	+	NT
シュクロース	+	NT
イノシトール	±	NT
L-ラムノース	-	NT
L-ラフィノース	+	NT
マンニトール	-	NT
デンプン	+	NT
D-マンノース	±	NT
メリビオース	+	NT
ラクトース	+	+
D-ガラクトース	+	NT
マルトース	+	+
サリシン	±	NT
トレハロース	+	NT
グリセリン	±	NT
キサンチン	±	NT

注) + : 陽性, ± : 弱陽性, - : 陰性, NT : 試験せず

#### 【0018】5) 生化学的性質

##### ①菌体色素

カロチノイド系色素を生産する。

##### ②イソプレノイドキノンの分子種

メナキノン (MK-7) のみを有する。

##### ③DNAのGC含量 (HPLC法による)

G+C (mol%) = 47.5

【0019】以上の微生物学的性質をまとめると、本菌株はグラム陰性、通性嫌気性の桿菌で、培養中に長径50μm程度の長い細胞が観察される。運動性は有さない。普通寒天培地等で滑走性を示す。生育温度範囲は15～37℃で、オキシダーゼ試験は陰性であり、カタラーゼ試験は陽性である。NaCl 2%を添加した培地では生育するが3%添加した培地では生育しない。また菌体色素としてカロチノイドを有し、菌体イソプレノイドキノンはメナキノン (MK-7) を有し、DNAのGC含量は47.5mol%である (HPLC法)。このような性質を有する菌をバーギーズ・マニュアル・オブ・\*

\* デターミネティブ・バクテリオロジ第8版 (Baergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., 1975), 及びバーギーズ・マニュアル・オブ・システムマテ

30 イック・バクテリオロジ (Baergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984), 及びその他の文献によって検索した結果、本菌株はフレキシバクター (Flexibacter) 属に属する細菌であると判断される。次に、本菌株をフレキシバクター属の公知の種 (species) と比較した結果、本菌株に類似した菌種として、フレキシバクター フレキシリス (F. flexilis), フレキシバクター エレガンス (F. elegans), フレキシバクター フィリホルミス (F. filiformis) が挙げられた。上記3菌種とQ17897株を比較した結果を以下の表に示した。

#### 【0020】Q17897と類似菌種の比較

#### 【0021】

#### 【表3】

	1. <i>F. flexilis</i>	2. <i>F. elegans</i>	3. <i>F. filiformis</i>	4. Q17897
菌体長	10 - > 50	1.0 - 80		0.8 - > 50
菌体幅	0.5	0.4	0.6 - 0.4	0.4 - 0.8
色調	Orange	Bright orange	Golden yellow	Orange
炭素源の利用性				
ゼラチン	+	+	+	+
デンプン	+	-	-	+
インドール産生	-	-	-	-
硫化水素の産生	+	-	-	-
硝酸塩の還元性	-	-	-	-
カタラーゼ	-	-	-	+
オキシダーゼ	+	+	+	-
NaClの生育阻止濃度 (%)	2.4	0.3	2.0	2 - 3
生育限界温度 (°C)	40 - 45	40 - 45	40 - 45	37 - 40
至適 pH	7	7	7	7
DNAの塩基組成 (mol % G + C)	40 - 43	(48)	46 - 47	47

【0022】この結果より本菌株は、オキシダーゼ生産性、カタラーゼの生産性、及び生育温度範囲において上記3菌種と異なっており、特にフレキシバクター フレキシリスとは硫化水素の産生及びDNAの塩基組成が、フレキシバクター エレガンスとはデンプンの利用性が異なり、一方フレキシバクター フィリホルミスとはNaClの生育阻止濃度が異なっていた。従って本菌株と一致する既知菌種は見あたらず、本菌株をフレキシバクター属の新種と判断し、フレキシバクター エスピー (Flexibacter sp.) Q17897と命名した。なお本\*50

\* 菌株は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第13305号 (FERM P-13305) として寄託されている。

【0023】(製造法) 本発明の新規生理活性物質(新規目的化合物)の製造法を実施するに当たり、該化合物の生産菌株フレキシバクター エスピー Q17897株の栄養源を含有する培地に接種し、好気的に発育させることにより、本発明の新規目的化合物を含む培養物が得られる。栄養物としては、細菌の栄養源として公知のものを使用すればよい。たとえば市販されているペプト

ン、肉エキス、コーン、スティアリカー、綿実粉、落花生粉、大豆粉、酵母エキス、NZ-アミン、カゼイン水解物、魚粉、硝酸ソーダ、硝酸アンモニウム等の無機または有機の窒素源、市販されている糖蜜、澱粉、デキストリン、蔗糖、グルコース、マルトース、フラクトース、ラムノース、グリセリン等の炭水化物あるいは脂肪等の炭素源が使用できる。

【0024】また金属塩として、Na、K、Mg、Ca、Zn、Fe等の硫酸塩、塩酸塩、硝酸塩、燐酸塩、炭酸塩等が必要に応じて添加される。さらに必要に応じてバリン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、リジン、アルギニン、システイン、シスチン等の他、通常知られているアミノ酸類や、オレイン酸メチル、ラード油シリコン脂、界面活性剤等の、本発明の新規生理活性物質（新規目的化合物）生成促進物質または消泡剤が適宜使用される。これらのもの以外でも、該生産菌が利用し、本発明の新規生理活性物質（新規目的化合物）の生産に役立つものであれば何れでも使用することができ、その培養方法は固体培養でも液体培養でもよい。

【0025】液体培養の場合は静置培養、攪拌培養、振盪培養等のいずれを実施してもよいが、特に通気攪拌培養が好ましい。また、培養温度は生産菌が発育し、本発明の化合物を生産する温度、すなわち15℃～37℃の範囲で適宜変更出来るが、およそ27℃が好ましい。培地のpHは4～9の範囲で適宜変更できるが、pH6～8が好ましい。培養時間は種々の条件によって異なり、10時間～72時間であるが、通常24時間～48時間程度で培養物中に蓄積される目的化合物が最高力価に達する。培養物から目的化合物を採取するには、微生物の生産する代謝産物に用いる通常の抽出、分離、精製の手段が適宜利用される。培養物中の目的化合物は培養物をそのままか、又は遠心分離により得られた培養上清あるいは培養物に過剰助剤を加え過して得られた培養上清液に、酢酸エチル、クロロホルム、ベンゼン、トルエン等の水と混和しない有機溶媒を加えて抽出する。

【0026】また、培養上清または培養上清液を適宜の担体に接触させ、上清又は上清液中の目的化合物を吸着させ、次いで適当な溶媒で溶出する事により目的化合物を抽出する事ができる。更に詳しく述べるならば、例えばアンバーライトXAD-2、ダイヤイオンHP20、ダイヤイオンCHP20PまたはダイヤイオンSP900のごとき多孔性吸着樹脂に接触させて目的化合物を吸着させる。ついでメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル等の有機溶剤と水の混合液を用いて目的物を溶出させる。この時の溶媒の混合比は、目的化合物が最も効率よく溶出しうる値にすることはいうまでもない。すなわち溶媒比率を低濃度より段階的、または連続的に高濃度まで上げて行くことにより、目的化合物の含まれる比率の、より高い画分を得ることが出来る。

【0027】酢酸エチル、クロロホルム等の有機溶媒で抽出する場合には、培養上清または培養上清液にこれらの溶媒を加え、よく振盪し、目的化合物を抽出する。つぎに上記の各操作法を用いて得られた目的化合物含有画分は常用の吸着担体、例えば活性炭、アルミナ、シリカゲル、セルロース等を担体に用いたカラムクロマトグラフィーや、シリカゲル系ODS逆相担体のカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー等の常法により、更に純粋に分離精製することができる。

#### 【0028】

【実施例】以下、実施例により、本発明の新規生理活性物質（新規目的化合物）の製造法について更に詳細に説明する。なお、実施例の文章中、Q17897-A、Q17897-B及びQ17897-H2-1の夫々の記載は実施例により得られた本発明化合物名を意味し、本発明の微生物の菌株名をもとに命名したものである。

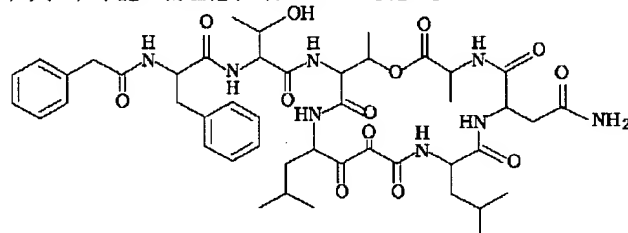
#### 【0029】実施例

グルコース1%、トリプトース（DIFCO LABORATORIES 社製）0.2%、イーストエキストラクト（DIFCO LABORATORIES 社製）0.1%、肉エキス（極東製薬工業社製）0.1%を含む培地（pH7.0）を作成し、この培地を500ml三角フラスコに各100mlずつ分注して、121℃で20分間滅菌した。この培地に、元スラントよりQ17897株の菌糸をかき取って接種し、毎分210回転の振とう培養を27℃で3日間行い種培養液とした。次に、ポリペプトン（大五栄養社製）1%、ドライイースト（DIFCO LABORATORIES 社製）0.1%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.05%、CaCl<sub>2</sub> 0.038%を含む培地（pH7.2）を5l作成し、この培地を500ml三角フラスコに各100mlずつ分注し、121℃で20分間滅菌したものに、種培養液を2%の割合で植菌し、毎分210回転の振とう培養を27℃で3日間行った。このようにして得られた培養液を毎分500回転の遠心分離を20分間行い、得られた培養上清液5lを1N塩酸でpH7に調整し、同量の酢酸エチルで2回抽出を行い、粗活性画分470mgを得た。この粗活性画分を少量のクロロホルムに溶解させた。次いで、クロロホルムで充填したワコーゲルC200（和光純薬社製）（2i.d.×19cm）のカラムに、クロロホルムに溶解させた粗活性画分を乗せ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。1フラクションを5mlとして分画し、移動相をクロロホルム（159ml）、クロロホルム-メタノール/98:2（300ml）、19:1（600ml）、4:1（250ml）と順次変化させたところ、クロロホルム-メタノール/19:1で溶出したフラクション101から114よりQ17897-Bを含む活性画分30mgを、フラクション115から167よりQ17897-AおよびQ17897-H2-1を含む活性画分57mgを得た。このうち、Q17897-A及びQ17897-H



13

2-1を含む活性画分を少量のメタノールに溶解させ、分取高速液体クロマトグラフィー〔カラム：STR-O DS-H 10 i. d. x 250mm (島津社製)、検出：UV 215nm、移動相：33%アセトニトリル、流速：5ml/min.〕により精製した。保持時間14~16分で単一ピークを示す画分を集めて濃縮後、酢酸エチルで抽出した。得られた酢酸エチル層を濃縮乾固することにより、Q17897-H2-1を白色粉末として8mg得た。同様に、保持時間19~21分で単一ピークを示す画分を集めて濃縮後、酢酸エチルで抽出した。得られた酢酸エチル層を濃縮乾固することにより、Q17897-Aを白色粉末として17mg得た。さらに、Q17897-Bを含む活性画分を上記条件で分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し、保持時間23~25分で単一ピークを示す画分を集めて濃縮後、酢酸エチルで抽出した。得られた酢酸エチル層を濃縮乾固することにより、Q17897-Bを白色粉末として11mg得た。上記抽出、分離、精製された化合物であるQ17897-A、Q-17897-B及びQ17897-H2-1は、夫々、下記の物理化学的性\*20



## 【0032】(2) Q17897-B

分子量：586 (分子量はFAB-MASSによって決定した。)

分子式：C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>

紫外外部吸収スペクトル：220nm (ε=47000), 281nm (ε=7100), 290nm (ε=5900)

赤外線吸収スペクトル：KBr法による赤外線吸収スペクトルは、第4図のとおりである。

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル：CD<sub>3</sub>ODを溶媒とする500MHzの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、第5図のとおりである。

<sup>13</sup>C-NMRスペクトル：DMSO-d<sub>6</sub>を溶媒とする125MHzの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは、第6図のとおりである。

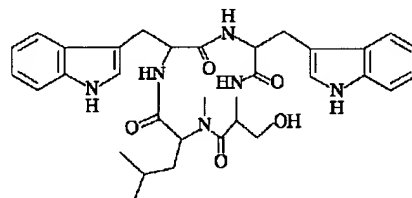
比旋光度：[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-85.0° (c=0.5, アセトニトリル)

上記の理化学的性状からQ17897-Bの化学構造は下式のものが示唆される。

【0033】

【化6】

※

※  
30

## 【0034】(3) Q17897-H2-1

分子量：900 (分子量はFAB-MASSによって決定した。)

分子式：C<sub>43</sub>H<sub>64</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>

紫外外部吸収スペクトル：末端吸収

赤外線吸収スペクトル：KBr法による赤外線吸収スペクトルは、第7図のとおりである。

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル：DMSO-d<sub>6</sub>を溶媒とする500MHzの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、第8図のとおりである。

<sup>13</sup>C-NMRスペクトル：DMSO-d<sub>6</sub>を溶媒とする125MHzの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは、第9図のとおりである。

比旋光度：[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-1.8° (c=0.5, アセトニトリル)

上記の理化学的性状からQ17897-H2-1の化学構造は下式のものが示唆される。

50

14

\*質及び化学構造式を示すことが確認された。

【0030】(1) Q17897-A

分子量：934 (分子量はFAB-MASSによって決定した。)

分子式：C<sub>46</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>

紫外外部吸収スペクトル：末端吸収

赤外線吸収スペクトル：KBr法による赤外線吸収スペクトルは、第1図のとおりである。

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル：DMSO-d<sub>6</sub>を溶媒とする500MHzの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、第2図のとおりである。

<sup>13</sup>C-NMRスペクトル：DMSO-d<sub>6</sub>を溶媒とする125MHzの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは、第3図のとおりである。

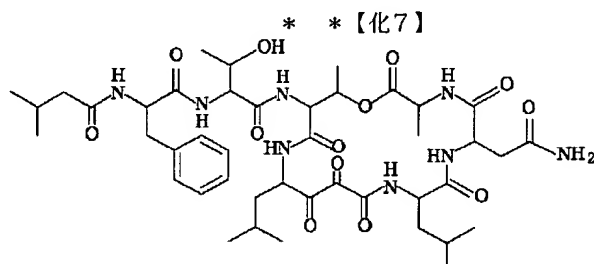
比旋光度：[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-10.1° (c=0.2, アセトニトリル)

上記の理化学的性状からQ17897-Aの化学構造は下式のものが示唆される。

【0031】

【化5】

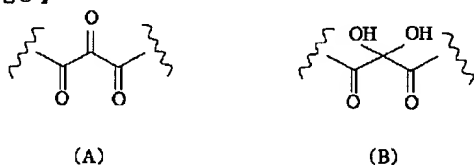
【0035】



【0036】本発明化合物中、上記Q17897-A及びQ17897-H2-1は、下記部分構造(A)のトリケト構造を有する点にも特徴がある。

【0037】

【化8】



【0038】しかしながら、トリケト構造(A)を有する化合物は、水分子が付加結合した部分構造(B)のジケトジオール構造を有する化合物(以下便宜上水和物と称する)の方が熱力学的に安定であるため、水が存在する状態においては、その一部または全部がその水和物に変化するものと予想される。事実、本発明化合物Q17897-A又はQ17897-H2-1の理化学的データは、トリケト構造(A)を支持する一方で、<sup>1</sup>H-NMRデータにおいては、水和物の2個のプロトンに対応するピークが化学シフト7.4ppm付近に検出され、さらに<sup>13</sup>C-NMRにおいても95ppm付近に水和物由来のピークが検出されることから、水和物の存在が確認された。

【0039】このことは、そのNMR測定の際、空気中あるいはDMSO-d<sub>6</sub>中に存在した微量の水分と結合して水和物を形成したことによるものと考えられる。従って、本明細書特許請求の範囲や詳細な説明において、本発明化合物Q17897-A及びQ17897-H2-1はトリケト構造だけに限定されず、それらの水和物を含むものと解釈されるべきである。

【0040】

【発明の効果】本発明化合物は、ヒト白血球由来のエラスターゼに対する優れた阻害作用を示すことから、肺疾患(特に肺気腫及びARDS)やリウマチ様関節炎、気管支炎、骨関節炎、脊椎炎、狼瘡、乾癬のような炎症症状の治療又は予防に有用である。

【0041】本発明化合物の優れたエラスターゼ阻害作用は、以下の方法により確認された。

(エラスターゼ阻害活性測定法) ヒト好中球エラスターゼを用いて、Schiesslerらの方法(Hoppe-Seyler'sZ. Physiol. Chem. 358, 53(1977))を基本としたわずか ※50

※な変法により行った。すなわち、好中球エラスターゼに比較的特異性の高い合成基質[サクシニル-アラニル-アラニル-アラニル-p-ニトロアニリド(Suc-Ala-Ala-Ala-pNA)](ペプチド研究所製)を用いた比色法により測定した。0.2Mトリエタノールアミン-塩酸緩衝液(pH 7.8)の624μlにヒト好中球エラスターゼ(アテンズ・リサーチ・アンド・テクノロジー・インコーポレーション社製)(100μg/ml 0.001N塩酸)の33μlと測定検体溶液10μlを加えて、25℃で10分間インキュベートした後、Suc-Ala-Ala-Ala-pNA液(1.35mg/ml上記緩衝液)の333μlを加えて1mlとして、さらに20分間インキュベートした。反応液にフェニルメチルスルホンフルオリド(0.1M)の10μlを加えて反応を停止した後、遊離したp-ニトロアニリドを405nmの吸光度で測定し、次式によって阻害率を求めた。

$$\text{阻害率}(\%) = [1 - (\text{検体値} - \text{ブランク値}) / (\text{コントロール値} - \text{ブランク値})] \times 100$$

【0042】上記方法により算出したQ17897-Aのエラスターゼ阻害活性のIC<sub>50</sub>値は6.7×10<sup>-8</sup>Mであった。

【0043】本発明化合物(I)、(II)またはそれらの塩を主成分として有する薬剤組生物は、当分野において通常用いられている製剤用担体、賦形剤等を用いて、通常使用されている方法によって調製することができる。投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与、あるいは静注、筋注等の注射剤、坐剤等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。投与量は投与する対象、投与ルートなどによって変動するが、通常0.1~200mg/kg/日、好ましくは1~100mg/kg/日である。

【図面の簡単な説明】

【図1】Q17897-Aの赤外線吸収スペクトルを示す。

【図2】Q17897-Aの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。

【図3】Q17897-Aの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。

【図4】Q17897-Bの赤外線吸収スペクトルを示す。

【図5】Q17897-Bの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。

17

【図6】Q17897-Bの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。

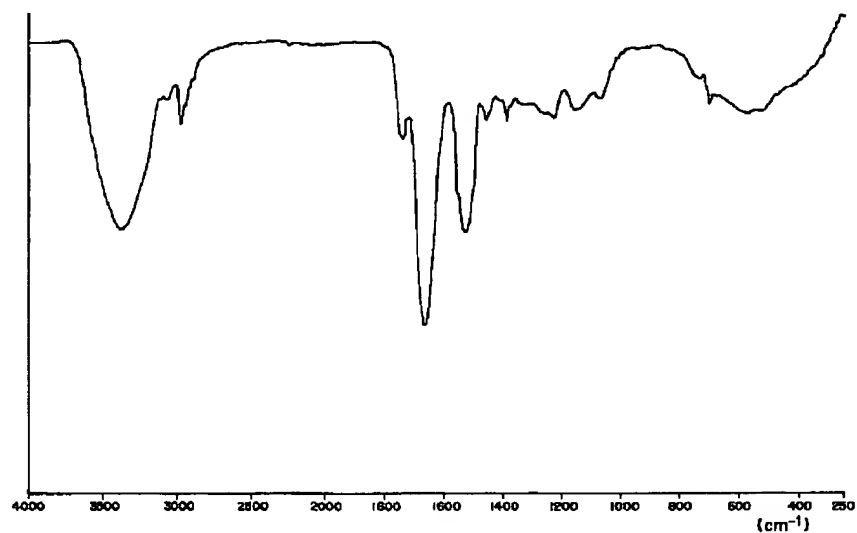
【図7】Q17897-H2-1の赤外線吸収スペクトルを示す。

18

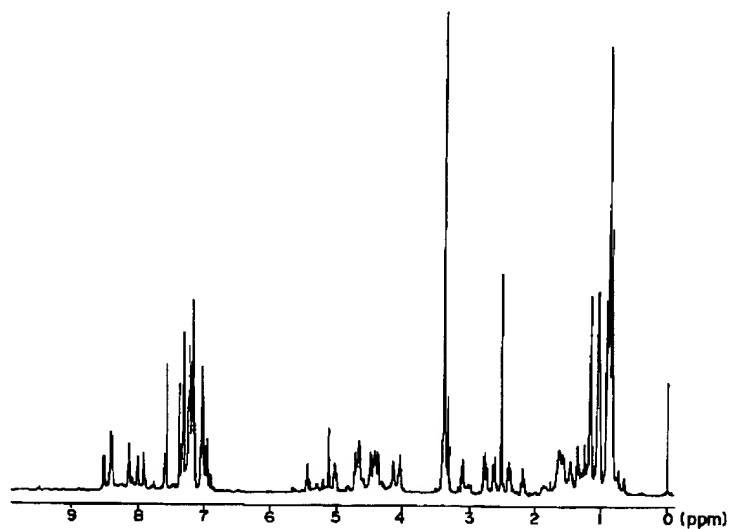
【図8】Q17897-H2-1の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す。

【図9】Q17897-H2-1の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。

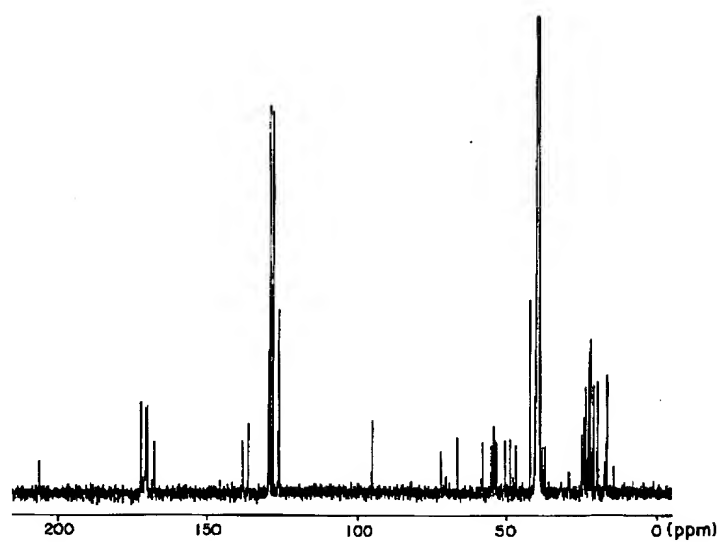
【図1】



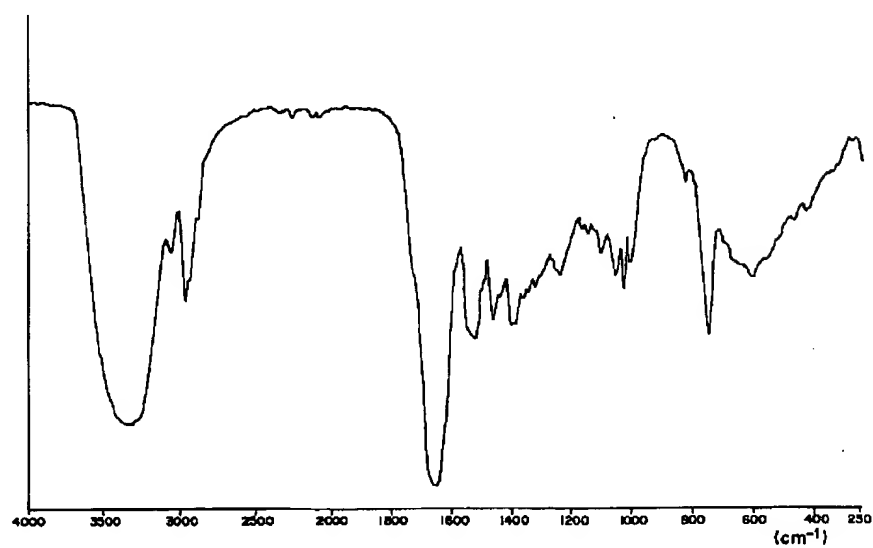
【図2】



【図3】



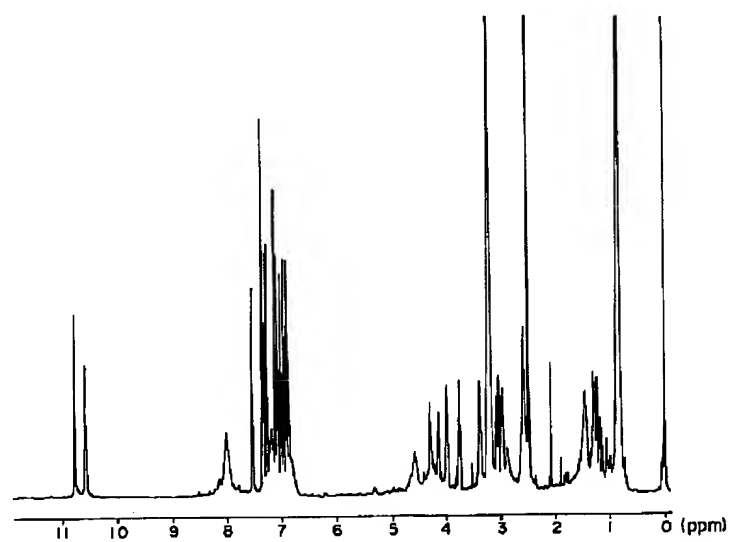
【図4】



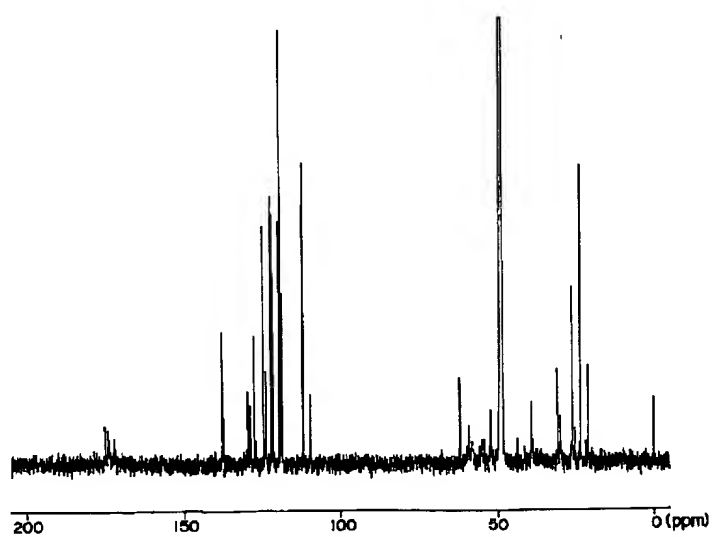
(12)

特開平6-172385

【図5】



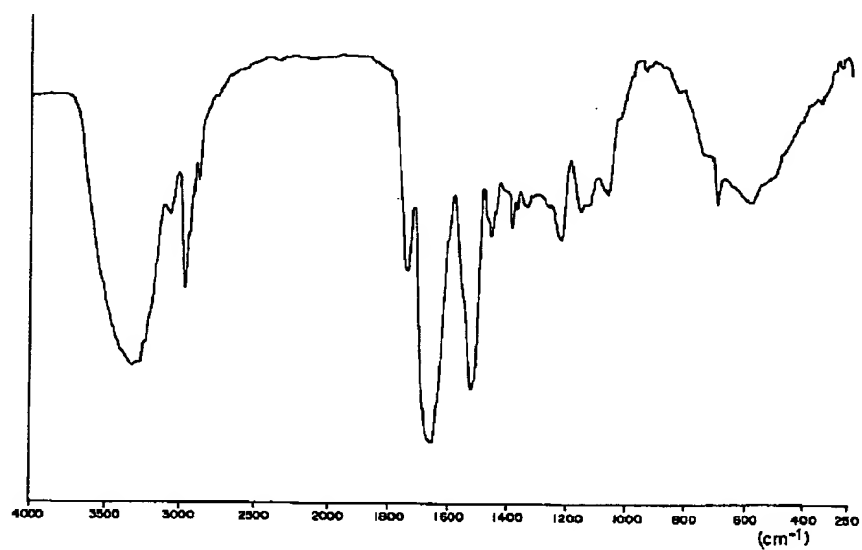
【図6】



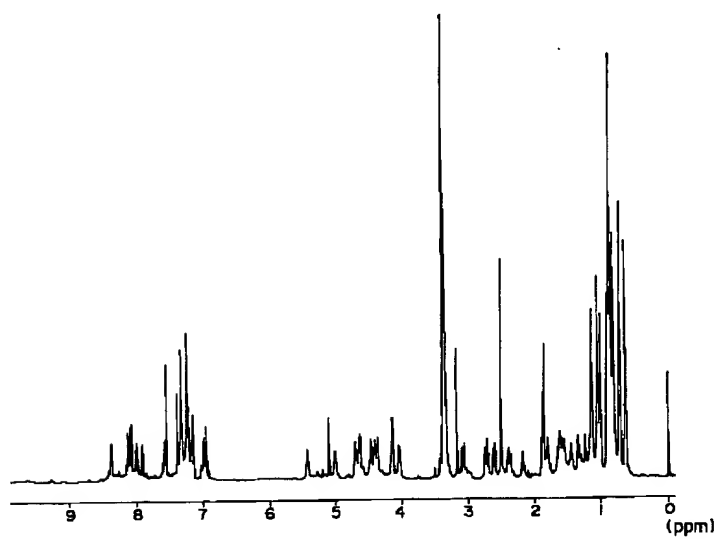
(13)

特開平6-172385

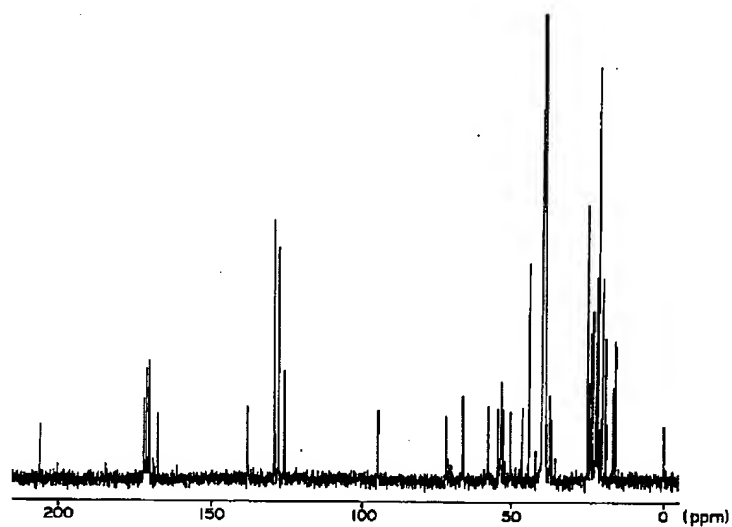
【図7】



【図8】



【図9】



---

フロントページの続き(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:01)

(72)発明者 柴崎 充至

東京都板橋区蓮根3-16-1 山之内製薬

蓮根寮

(72)発明者 阿部 賢二

埼玉県上尾市小泉406-3

(72)発明者 今井 美光

神奈川県川崎市中原区木月599

(72)発明者 鈴木 賢一

埼玉県北本市二ツ家1-67

**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

(19) 【発行国】 日本国特許庁 ( J P )	(19)[ISSUINGCOUNTRY] Japan Patent Office (JP)
(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)	Laid-open (Kokai) patent application number (A)
(11) 【公開番号】 特開平 6 - 1 7 2 3 8 5	(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER] Unexamined-Japanese-Patent No. 6-172385
(43) 【公開日】 平成 6 年 ( 1 9 9 4 ) 6 月 2 1 日	(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION] Heisei 6 (1994) June 21
(54) 【発明の名称】 新規な環状ペプチド化合物及び その製造法	(54)[TITLE] A novel cyclic-peptide compound and its manufacturing method
(51) 【国際特許分類第 5 版】 C07K 5/12 8318- 4H A61K 37/02 AED 8314-4C 5/08 C07K 5/08 8318-4H (C12P21/02 C12P 21/02 ZNA A 8214-4B // C12N 9/99 (C12P 21/02 C12R 1:01 )	(51)[IPC] C07K 5/12 8318-4H A61K37/02 AED 8314-4C C07K 5/08 8318-4H C12P21/02 ZNAA8214- 4B//C12N 9/99 (C12P21/02 C12R 1:01 )
【審査請求】 未請求	[EXAMINATIONREQUEST] UNREQUESTED
【請求項の数】 3	[NUMBEROFCLAIMS] 3
【全頁数】 1 4	[NUMBEROFPAGES] 14
(21) 【出願番号】 特願平 4 - 3 5 1 7 2 5	(21)[APPLICATIONNUMBER] Japanese Patent Application No. 4-351725



(22) 【出願日】

平成4年(1992) 12月8  
日

(22)[DATEOFFILING]

Heisei 4 (1992) December 8

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

000006677

[IDCODE]

000006677

【氏名又は名称】

山之内製薬株式会社

Yamanouchi pharmaceutical K.K.

【住所又は居所】

東京都中央区日本橋本町2丁目  
3番11号

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 寺村 恭子

Kyoko Teramura

【住所又は居所】

東京都板橋区小豆沢4-11-  
11 ジョイファースト205  
号

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 安室 憲一

Kenichi Amuro

【住所又は居所】

埼玉県浦和市大谷場1-4-3  
0

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 鈴木 康人

Yasuhito Suzuki

【住所又は居所】

東京都台東区柳橋1-12-5

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 柴崎 充至

Mitsushi Shibasaki

【住所又は居所】

[ADDRESS]

東京都板橋区蓮根 3 - 1 6 - 1  
山之内製薬蓮根寮

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 阿部 賢二

Kenji Abe

【住所又は居所】

[ADDRESS]

埼玉県上尾市小泉 4 0 6 - 3

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 今井 美光

Yoshimitsu Imai

【住所又は居所】

[ADDRESS]

神奈川県川崎市中原区木月 5 9  
9

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 鈴木 賢一

Kenichi Suzuki

【住所又は居所】

[ADDRESS]

埼玉県北本市二ツ家 1 - 6 7

(74) 【代理人】

(74)[PATENTAGENT]

【弁理士】

[PATENTATTORNEY]

【氏名又は名称】

長井 省三 (外 1 名)

Shozo Nagai (et al.)

(57) 【要約】

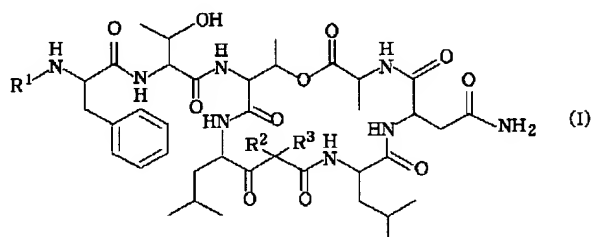
(57)[SUMMARY]

**【構成】**

下記の一般式 (I) 又は式 (II) からなる群から選択される一の新規環状ペプチド化合物又はその塩又はこれらの製造法。

**[SUMMARY OF THE INVENTION]**

The one novel cyclic-peptide compound chosen from the group comprising the below-mentioned general formula (I) or a formula(II), its salt, or these manufacturing methods.

**【化 1】****[COMPOUND 1]**

(式中の各記号は、下記の意味を有する。)

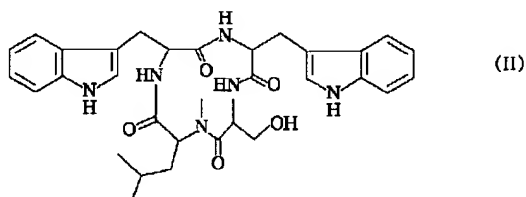
R<sup>1</sup>: ベンジルカルボニル基又はイソバレリル基

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>: 夫々水酸基, 又は一体となってカルボニル酸素)

(Each symbol has the below-mentioned meaning in the formula.

R1: A benzyl carbonyl group or an iso valeryl group

R2, R3: respectively hydroxyl group or carbonyl oxygen together.)

**【化 2】****[COMPOUND 2]****【効果】**

医薬, 特にエラスターゼ阻害剤

**[EFFECTS]**

It is useful to the pulmonary emphysema etc. as

として、肺気腫等に有用である。 a pharmaceutical, especially an elastase inhibitor.

## 【特許請求の範囲】

## [CLAIMS]

## 【請求項 1】

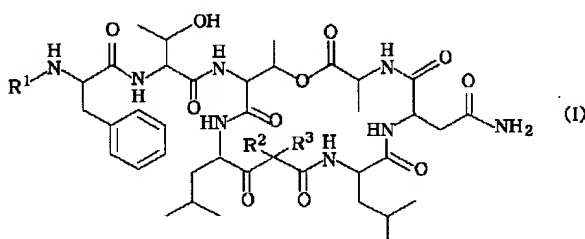
## [CLAIM 1]

下記一般式 (I)

Following general formula (I)

## 【化 1】

## [COMPOUND 1]



(式中の各記号は、下記の意味を有する。)

R<sup>1</sup> : ベンジルカルボニル基又はイソバレリル基

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> : 夫々水酸基, 又は一体となってカルボニル酸素) 又は下式(II)

(Each symbol has the below-mentioned meaning in the formula.

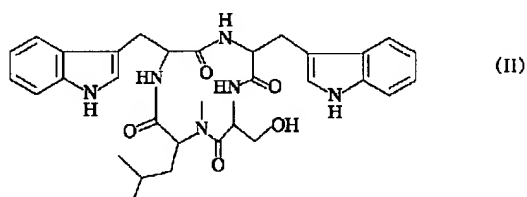
R<sup>1</sup>: A benzyl carbonyl group or an iso valeryl group

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>: respectively hydroxyl group or carbonyl oxygen together.)

Or following expression (II)

## 【化 2】

## [COMPOUND 2]



からなる群より選択される一の新規環状ペプチド化合物又はその塩。

The one novel cyclic-peptide compound or its salt chosen from the group comprising these.

**【請求項 2】**

フレキシバクター (**Flexibacter**) 属に属し、請求項 1 に記載の新規環状ペプチド化合物を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に生成蓄積した新規環状ペプチド化合物を採取することを特徴とする該新規環状ペプチド化合物の製造法。

**[CLAIM 2]**

It belongs to a Flexibacter (Flexibacter) genus, the microorganisms which have the capability which produces the novel cyclic-peptide compound of Claim 1 are cultivated to a culture medium, and the novel cyclic-peptide compound produce-accumulated in the culture is collected.

The manufacturing method of this novel cyclic-peptide compound characterized by the above-mentioned.

**【請求項 3】**

フレキシバクター (**Flexibacter**) 属に属する微生物が、フレキシバクター エスピー (**Flexibacter** sp.) Q 1 7 8 9 7 (微工研菌寄第 1 3 3 0 5 号) である請求項 2 記載の製造法。

**[CLAIM 3]**

The manufacturing method of Claim 2 whose microorganisms belonging to a Flexibacter (Flexibacter) genus are Flexibacter sp (Flexibacter sp.) Q17897 (FERM P No. 13305).

**【発明の詳細な説明】**

**[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]**

**【0001】**

**[0001]**

**【産業上の利用分野】**

本発明は医薬、殊にヒト白血球由来のエラスターゼ阻害物質として有用な環状ペプチド化合物及び発酵法による該阻害物質の製造法に関する。

**[INDUSTRIAL APPLICATION]**

This invention relates to a pharmaceutical, a cyclic-peptide compound useful as an elastase inhibitor derived from a human leucocyte, and the manufacturing method of this inhibition material by bacterial coupling.

**【0002】**

**[0002]**

**【従来技術】**

ヒト白血球由来のエラスターゼは、肺疾患〔特に肺気腫及び呼吸窮迫症候群 (ARDS)〕やリ

**[PRIOR ART]**

It is already known that the elastase of the human leucocyte origin, contributes to the connective-tissue destruction relevant to inflammation, such as pulmonary disorders

ウマチ様関節炎等の炎症に関連する結合組織破壊に寄与していることが既に知られている。エラスターゼは、結合組織の主要な構成成分の一つであるエラスチンを特異的に分解する酵素である。エラスターゼの活性調節には、ヒト血清中に存在する糖タンパク質であり、エラスターゼの天然阻害物質の一つである $\alpha_1$ -アンチトリプシンの関与が大きいと考えられている。遺伝的要因又は生体内過酸化物質の影響による血清 $\alpha_1$ -アンチトリプシン量の著明な減少は、エラスターゼ過剰状態を引き起こし、エラスチンの分解に伴う結合組織破壊が亢進する結果として上記疾患が発現するものと想定されている。エラスターゼ阻害剤は、この様なエラスターゼによるエラスチンの分解を抑制することにより、結合組織破壊を抑えることができると考えられる。従って、エラスターゼ阻害剤は、エラスチンが分解されることによって引き起こされると考えられる肺疾患（特に肺気腫及びARDS）やリウマチ様関節炎、気管支、骨関節炎、脊椎炎、狼瘡、乾癬等のような炎症症状の治療又は予防に有用である。

#### 【0003】

従来、天然のエラスターゼ阻害作用を有する物質としては、ペプチドタイプと非ペプチドタイプのものが知られている。これらの内、特に本発明に関連するペプチドタイプの阻害物質としては、WO 90/12805に

[especially, pulmonary emphysema and a respiration-distress syndrome (ARDS)] and rheumatism arthritis.

An elastase is an enzyme which decomposes specifically the elastin which is the one of the main structural components of a connective tissue.

It is considered by active regulation of an elastase for the relationship of 1-antitrypsin which is glycoprotein which exists in a human blood serum, and is the one of the natural inhibitor of an elastase ( $\alpha$ ) to be large.

It is assumed that significant decreasing of the blood serum ( $\alpha$ ) 1-antitrypsin amount under the influence of a hereditary factor or an oxidant in the living body causes an overelastase state, and said illness expresses as a result to which the connective-tissue destruction accompanied to a decomposition of elastin rises.

It is thought that an elastase inhibitor can restrain connective-tissue destruction by suppressing a decomposition of the elastin by such elastase.

Therefore, the elastase inhibitor is useful to the treatment or prevention of the pulmonary disorders (especially pulmonary emphysema and ARDS) considered to be caused by decomposing elastin, the rheumatism arthritis, a bronchus, an osteoarthritis, the spondylitis, the lupus, psoriasis, etc. of the inflammation symptom.

#### [0003]

Conventionally, as a material which has a natural elastase inhibitory effect, the peptide type and non-peptide type thing is known.

As a peptide type inhibitor especially relevant to this invention, the elastatinal of WO90/12805 and WS7622A of Unexamined-Japanese-Patent No. 3-218387 are mentioned among these.

記載のエラストチナールや特開平3-218387に記載のWS7622Aが挙げられる。なお、WS7622Aは前記公報には化学構造は開示されていないが、そのスルホネートの部分構造を開示した欧州特許第465895号公報の記載によれば、非環状ペプチドタイプの物質である。

In addition, WS7622A is although the chemical constitution is not indicated by said gazette, according to description of the EP No. 465895 gazette which indicated the partial structure of the sulfonate, it is a non-cyclic-peptide type material.

【0004】

[0004]

【発明が解決しようとする課題】

このような状況の中で、本発明者らは天然に存在する多くの微生物が生産する物質について研究を行っていたところ、フレキシバクター属に属する新菌種を培養する事によって、培地中に優れたエラスターゼ阻害作用を示し、上記阻害物質とは化学構造を異にする環状ペプチド構造を有する新規物質が生産されることを見出し、更にこの物質を単離することにより本発明を完成した。従って、本発明の目的は新規エラスターゼ阻害物質を提供することにある。また、本発明の別の目的はフレキシバクター属に属する微生物を用いる発酵法により製造する事を特徴とする、エラスターゼ阻害物質の製造法を提供することにある。更に本発明の目的は、フレキシバクター属に属する新規微生物を提供することにある。本発明の更にもう一つの目的は、本発明化合物(I)、(II)またはそれらの塩を含有する医薬組成

【PROBLEM ADDRESSED】

In such a situation, the present inventors was inquiring about the material which many microorganisms which exist naturally produce.

It finds out that the novel material which has the cyclic-peptide structure which shows an excellent elastase inhibitory effect in a culture medium, and differs in a chemical constitution with said inhibitor by cultivating the new microbial species belonging to a Flexibacter genus is produced, furthermore, this invention was perfected by isolating this material.

Therefore, objective of the invention is to provide a novel elastase inhibitor.

Moreover, another objective of this invention is to provide the manufacturing method of the elastase inhibitor characterized by manufacturing with the bacterial coupling using the microorganisms belonging to a Flexibacter genus.

Furthermore, objective of the invention is to provide the novel microbe belonging to a Flexibacter genus.

The furthermore, another objective of this invention is providing the pharmaceutical composition which contains this invention compound (I), (II) or those salts.

物を提供することである。

【0005】

[0005]

【課題を解決するための手段】  
すなわち、本発明は下記一般式  
(I) 又は式(II)で示される新規  
な環状ペプチド化合物又はその  
塩に関する。

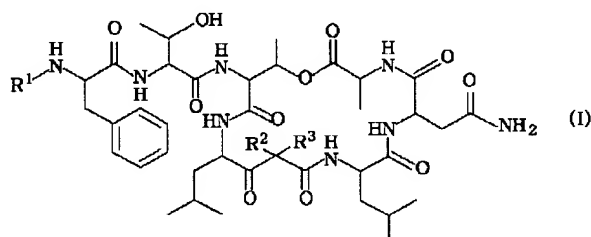
**[SOLUTION OF THE INVENTION]**

That is, this invention relates to the novel  
cyclic-peptide compound or novel its salt shown  
by the following general formula (I) or the  
formula(II).

【0006】

[0006]

【化3】

**[COMPOUND 3]**

【0007】

(式中の各記号は、下記の意味  
を有する。

R<sup>1</sup> : ベンジルカルボニル基又は  
イソバレリル基

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> : 夫々水酸基, 又は  
一体となってカルボニル酸素)

[0007]

(Each symbol has the below-mentioned  
meaning in the formula.

R<sup>1</sup>: A benzyl carbonyl group or an iso valeryl  
group

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>: hydroxyl group, respectively, or  
carbonyl oxygen together).

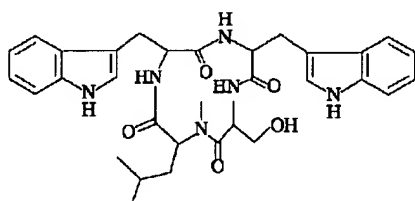
【0008】

[0008]

【化4】

**[COMPOUND 4]**





(II)

## 【0009】

本発明化合物 (I) 又は (II) は、酸付加塩を形成する場合がある。また、塩基との塩を形成する場合もある。かかる塩としては、具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の鉱酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸等の有機酸、アスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸との酸付加塩、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウムなど無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミンなどの有機塩基、リジン、オルニチンなどの塩基性アミノ酸との塩やアンモニウム塩等が挙げられる。また、本発明化合物は不斉炭素原子を有しており、光学異性体が存在する。本発明の目的化合物には、これら光学異性体の単離されたもの及びその混合物が含まれる。さらに、本発明化合物は水和物又はメタノール、エタノール等との溶媒和物を形成することもある。本発明の目的化合物にはこれらのものも含まれる。

## [0009]

This invention compound (I) or (II) may form an acid-added salt.

Moreover, a salt with a base may be formed.

As this salt, specifically

Mineral acids, such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, hydroiodic acid, a sulfuric acid, nitric acid, and phosphoric acid, organic acids, such as a formic acid, an acetic acid, a propionic acid, an oxalic acid, malonic acid, a succinic acid, a fumaric acid, a maleic acid, lactic acid, malic acid, tartaric acid, a citric acid, a methane sulfonic acid, and an ethane sulfonic acid, an acid-added salt with acidic amino acids, such as aspartic acid and glutamic acid, inorganic bases, such as sodium, potassium, magnesium, calcium, and an aluminium, organic bases, such as a methylamine, an ethylamine, and an ethanolamine, a salt with basic amino acids, such as a lysine and ornithine, an ammonium salt, etc. are mentioned.

Moreover, this invention compound has the asymmetric carbon atom, and optical isomers exist.

The thing with which these optical isomers were isolated, and its mixture are contained in an objective-of-the-invention compound.

Furthermore, this invention compound may form a solvate with a hydrate or methanol, ethanol, etc.

These things are also contained in an objective-of-the-invention compound.

**【0010】**

本発明の製造法は、フレキシバクター属に属する新規環状ペプチド化合物を生産する能力を有する微生物を培養し、培地中に生成蓄積させ行うことができる。また、本発明の製造法は、上記の新規生理活性物質（新規目的化合物）を生産する能力を有する微生物を培養し、培地中に該化合物を生産させ、次いで該化合物を採取することからなる新規環状ペプチド化合物の製造法である。本発明の新規環状ペプチド化合物を生産する菌株は次のような菌学的性状を有する。

**【0011】**

**【フレキシバクター エスピー (Flexibacter sp.) Q17897 株の微生物学的性質】**

本菌株は沖縄県、座間味島より採取された土壌より分離された細菌で上記の菌株番号を付与された。

**【0012】****1) 形態**

肉汁寒天培地上で、33℃、5日間培養した細菌は0.2～0.4×0.4～15μmの桿菌で、胞子を形成せず運動性は無い。グラム染色性は陰性である。また、以下に示す組成の培地（グルタミン酸ナトリウム0.5%、イーストエキストラクト（DIFCO LABORATORIES 社製）0.1%、硫酸マグネシウ

**[0010]**

The manufacturing method of this invention can cultivate the microorganisms which have the capability which produces the novel cyclic-peptide compound belonging to a Flexibacter genus, can be made to be able to produce-accumulate them in a culture medium, and can be performed.

Moreover, the manufacturing method of this invention is a manufacturing method of the novel cyclic-peptide compound comprising cultivating microorganisms with the capability which produces said novel bioactive substance (novel target compound), producing this compound in a culture medium, and collecting this compound then.

The microbial strain which produces the novel cyclic-peptide compound of this invention has the characteristic of the following mycologies.

**[0011]**

**[A Flexibacter sp (Flexibacter sp.) Q17897 strain microbiological characteristic]**

This-microbial strain was provided in said microbial strain number with the bacteria separated from the soil collected from Zamami island Okinawa Prefecture.

**[0012]****1) Form**

The bacteria cultivated at 33 degrees-Celsius for five days on the broth agar medium are 0.2-0.4X0.4 to 15-micrometer Bacillus, a spore is not formed but there is no manoeuvrability.

Gram's stain property is negative.

Moreover, a long cell 50 micrometer or more is observed on the culture medium (0.5 % of sodium glutamates, yeast extract (Made by DIFCO LABORATORIES) 0.1%, 0.1 % of magnesium sulfate, and glucose 0.2%, 1.5 % of agar, pH7.2) of the composition shown below.

ム 0.1%, グルコース 0.2%,  
寒天 1.5%, pH 7.2) 上  
で 50  $\mu$ m 以上の長い細胞が観  
察される。

**【0013】**

2) 各種培地における生育の性  
状

(1) 普通寒天培地上では、オレ  
ンジ色で周縁部の盛り上がった  
形状のコロニーが観察され、滑  
走性が認められる。

(2) ハート・インフュージョン  
液体培地で培養 24 時間後に培  
地上部が濁るのが観察され、培  
養 5 日後には培地全体が濁り皮  
膜も観察される。

(3) リトマスミルクで培地では  
2 日目頃からペプトン化が始  
まり培地が酸性となるが、凝固  
は認められない。

**【0014】**

3) 生理的性質

**【0015】****【表 1】****[0013]**

2) The characteristic which is growth in  
various culture medium

(1) On a nutrient agar medium, the colony of  
the shape where the peripheral part rose in  
orange is observed, and skid property is  
accepted.

(2) It is observed that culture medium upper  
part becomes muddy 24 hours after a culture in  
a heart \* infusion liquid medium, after culture  
five days, the whole culture medium becomes  
muddy and a skin layer is also observed.

(3) A coagulate is not accepted, although the  
peptonization begins from second-day in a  
culture medium with litmus milk and a culture  
medium becomes acidic.

**[0014]**

3) Physiological characteristic

**[0015]****[Table 1]**

VP テスト	: 陰 性
インドールの生成	: 陰 性
硫化水素の生成	: 陰 性
クエン酸の利用性 (シモンズ培地)	: 陰 性
硝酸ナトリウムの利用性	: 陰 性
ゼラチンの液化	: 陽 性
オルニチン脱炭酸	: 弱陽 性
リジン脱炭酸	: 陰 性
オキシダーゼ	: 陰 性
カタラーゼ	: 陽 性
ウレアーゼ	: 陰 性
DNase の生成	: 陰 性
IPA	: 陰 性
OF テスト	: O 型
脱脂牛乳の凝固	: 陰 性
脱脂牛乳のペプトン化	: 陽 性
NaCl 添加培地での生育	: 2 % で生育するが 3 % 以上で生育しない
栄養要求性	: なし
生育温度範囲	: 15 ~ 37 °C
至適生育温度範囲	: 27 ~ 32 °C
生育 pH 範囲	: 5 ~ 9
至適生育 pH 範囲	: 7 ~ 8
色素の生成	: 陽 性
嫌気培養	: 陽 性

VP test: Negative

The formation of indole: Negative

The formation of a hydrogen sulfide: Negative

Utility of a citric acid (Simons' medium): Negative

Utility of sodium nitrate: Negative

Liquefying of gelatin: Positive

Ornithine decarboxylation: Weak positivity  
Lysine decarboxylation: Negative  
Oxidase: Negative  
Catalase: Negative  
Urease: Negative  
The formation of DNase: Negative  
IPA: Negative  
OF test: O type  
The coagulate of degreasing cow's milk: Negative  
Peptonization of degreasing cow's milk: Positive  
Growth by the NaCl addition culture medium: Although it grows at 2 %, do not growing by 3 % or more.  
Auxotrophy: None  
Growth temperature range: 15-37 degrees C  
Optimum growth temperature range: 27-32 degrees C  
Growth pH range: 5-9  
Optimum growth pH range: 7-8  
The formation of a pigment: Positive  
Anaerobic culture: Positive

【 0 0 1 6 】

4) 炭素源の利用性

[0016]

4) Utility of the source of a carbon

【 0 0 1 7 】

[0017]

【表 2】

[Table 2]

	糖の利用性	酸の生成
L-アラビノース	±	NT
D-キシロース	-	-
D-グルコース	+	+
D-フラクトース	+	NT
シュクロース	+	NT
イノシトール	±	NT
L-ラムノース	-	NT
L-ラフィノース	+	NT
マンニトール	-	NT
デンプン	+	NT
D-マンノース	±	NT
メリビオース	+	NT
ラクトース	+	+
D-ガラクトース	+	NT
マルトース	+	+
サリシン	±	NT
トレハロース	+	NT
グリセリン	±	NT
キサンチン	±	NT

注) + : 陽性, ± : 弱陽性, - : 陰性, NT : 試験せず

L- arabinose

D-xylose

D-glucose

D-fructose

Sucrose

Inositol

L-rhamnose

L- raffinose

Mannitol

Starch

D-mannose

Melibiose

Lactose

D-galactose

Maltose

Salicin

Trehalose

Glycerol

Xanthin

First row : Utility of saccharide, The formation of an acid

Note) +: Positive, +/-: Weak positivity, -: negative, NT : It does not examine.

**【0018】**

5) 生化学的性質

(1) 菌体色素

カロチノイド系色素を生産する。

(2) イソプレノイドキノンの分子種

メナキノン (MK-7) のみを有する。

(3) DNAのGC含量 (HPLC法による)

G+C (mol%) = 47.5

**[0018]**

5) Biochemical characteristic

(1) Microbial-cells pigment

A carotinoide type pigment is produced.

(2) The molecular species of an isoprenoid quinone

It has only a menaquinone (MK-7).

(3) The GC content of DNA (based on HPLC method)

G+C(mol%)=47.5

**【0019】**

以上の微生物学的性質をまとめると、本菌株はグラム陰性、通性嫌気性の桿菌で、培養中に長さ50  $\mu$ m程度の長い細胞が観察される。運動性は有さない。普通寒天培地等で滑走性を示す。生育温度範囲は15～37℃で、オキシダーゼ試験は陰性であり、カタラーゼ試験は陽性である。NaCl2%を添加した培地では生育するが3%添加した培地では生育しない。また菌体色素としてカロチノイドを有し、菌体イソプレノイドキノンはメナキノン (MK-7) を有し、DNAのGC含量は47.5 mol%である (HPLC法)。このような性質を有する菌をバーギーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バク

**[0019]**

If the above microbiological characteristic is summarized, this-microbial strain will be the Bacillus of a Gram negative and a facultativity anaerobiosis, and a long cell with a length of about 50 micrometer will be observed during a culture.

It does not have manoeuverability.

Skid property is shown by a nutrient agar medium etc.

A growth temperature range is 15-37 degrees-Celsius, an oxidase examination is negative and the catalase examination is positive.

Although it grows in the culture medium which added NaCl2%, it does not grow in the culture medium added 3%.

Moreover, it has carotinoide as a microbial-cells pigment, a microbial-cells isoprenoid quinone has a menaquinone (MK-7), and the GC content of DNA is 47.5 mol% (HPLC method).

The microbe which has such a characteristic, has been serched with

Baergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8thed., (Baergey's Manual of

テリオロジィ第8版 (Baergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., 1975), 及びバージェズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジィ (Baergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984), 及びその他の文献によって検索した結果, 本菌株はフレキシバクター (*Flexibacter*) 属に属する細菌であると判断される。次に, 本菌株をフレキシバクター属の公知の種 (species) と比較した結果, 本菌株に類似した菌種として, フレキシバクター フレキシリス (*E. flexilis*), フレキシバクター エレガンス (*E. elegans*), フレキシバクター フィリホルミス (*E. filiformis*) が挙げられた。上記3菌種とQ17897株を比較した結果を以下の表に示した。

Determinative Bacteriology, 8th ed., 1975), and Baergey's Manual of Systematic Bacteriology (Baergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984), and other reference.

Consequently, it is judged that this-microbial strain are the bacteria belonging to a *Flexibacter* (*Flexibacter*) genus.

Next, this-microbial strain was compared with the well-known species (species) of a *Flexibacter* genus.

Consequently, a *Flexibacter flexilis* (*F. flexilis*), a *Flexibacter elegans* (*F. elegans*), and *Flexibacter filiformis* (*F. filiformis*) were mentioned as a microbial species similar to this-microbial strain.

The result of having compared said 3 microbial species and Q17897 strain was shown to the following tables.

【0020】

Q17897と類似菌種の比較

[0020]

The comparison of Q17897 and a similar microbial species

【0021】

[0021]

【表3】

[Table 3]



	1. <i>E. flexilis</i>	2. <i>E. elegans</i>	3. <i>E. filiformis</i>	4. Q17897
菌体長	10 - > 50	1.0 - 80		0.8 - > 50
菌体幅	0.5	0.4	0.6 - 0.4	0.4 - 0.8
色調	Orange	Bright orange	Golden yellow	Orange
炭素源の利用性				
ゼラチン	+	+	+	+
デンプン	+	-	-	+
インドール産生	-	-	-	-
硫化水素の産生	+	-	-	-
硝酸塩の還元性	-	-	-	-
カタラーゼ	-	-	-	+
オキシダーゼ	+	+	+	-
NaClの生育阻止濃度 (%)	2.4	0.3	2.0	2 - 3
生育限界温度 (°C)	40 - 45	40 - 45	40 - 45	37 - 40
至適 pH	7	7	7	7
DNAの塩基組成 (mol % G + C)	40 - 43	(48)	46 - 47	47

Microbial-cells length

Microbial-cells width

Color tone

Utility of the source of a carbon

Gelatin

Starch

Indole production

A production of a hydrogen sulfide

The reducibility of nitrate

Catalase

Oxidase

Growth prevention concentration of NaCl (%)

Boundary-zones-of-distribution temperature (degree C)

Optimum pH

The base composition of DNA

**【0022】**

この結果より本菌株は、オキシダーゼ生産性、カタラーゼの生産性、及び生育温度範囲において上記3菌種と異っており、特にフレキシバクター フレキシリスとは硫化水素の産生及びDNAの塩基組成が、フレキシバクター エレガンスとはデンブンの利用性が異なり、一方フレキシバクター フィリホルミスとはNaClの生育阻止濃度が異なっていた。従って本菌株と一致する既知菌種は見あたらず、本菌株をフレキシバクター属の新種と判断し、フレキシバクター エスピー (*Flexibacter* sp.) Q17897と命名した。なお本菌株は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第13305号 (FERM P-13305) として寄託されている。

**【0023】**

(製造法) 本発明の新規生理活性物質 (新規目的化合物) の製造法を実施するに当たり、該化合物の生産菌株フレキシバクタ

**[0022]**

From this result, this-microbial strain differed from said 3 microbial species in oxidase productivity, productivity of catalase, and a growth temperature range, as for the *Flexibacter flexilis*, the production of a hydrogen sulfide and the base composition of DNA, is differed especially as for the *Flexibacter elegans*, the utility of a starch differed, and, on the other hand, *Flexibacter filiformis* differed in the growth prevention concentration of NaCl.

Therefore, the known microbial species which is in agreement with this-microbial strain was not found, but judged this-microbial strain to be the new species of a *Flexibacter* genus, and named it *Flexibacter* sp (*Flexibacter* sp.) Q17897.

In addition, this-microbial strain is deposited to the institute-of-technology microorganisms technology research laboratory as FERM P No. (FERM P-13305) 13305.

**[0023]**

(Manufacturing method)

In enforcing the manufacturing method of the novel bioactive substance (novel target compound) of this invention, the culture containing the novel target compound of this

ー エスピー Q17897株の栄養源を含有する培地に接種し、好氣的に發育させることにより、本發明の新規目的化合物を含む培養物が得られる。栄養物としては、細菌の栄養源として公知のものを使用すればよい。たとえば市販されているペプトン、肉エキス、コーン、ステープリカー、綿実粉、落花生粉、大豆粉、酵母エキス、N Z-アミン、カゼイン水解物、魚粉、硝酸ソーダ、硝酸アンモニウム等の無機または有機の窒素源、市販されている糖蜜、澱粉、デキストリン、蔗糖、グルコース、マルトース、フラクトース、ラムノース、グリセリン等の炭水化物あるいは脂肪等の炭素源が使用できる。

#### 【0024】

また金属塩として、Na, K, Mg, Ca, Zn, Fe 等の硫酸塩、塩酸塩、硝酸塩、磷酸塩、炭酸塩等が必要に応じて添加される。さらに必要に応じてバリン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、リジン、アルギニン、システイン、シスチン等の他、通常知られているアミノ酸類や、オレイン酸メチル、ラード油シリコン脂、界面活性剤等の、本發明の新規生理活性物質（新規目的化合物）生成促進物質または消泡剤が適宜使用される。これらのもの以外でも、該生産菌が利用し、本發明の新規生理活性物質（新規目的化合物）の生産に役立つものであれば何れ

invention is obtained by inoculating to the culture medium which contains the production strain Flexibacter sp Q17897 strain source of a nutrition of this compound, and making an aerobic target grow.

What is sufficient is just to use a thing well-known as a bacterial source of nutrition as a nutriment.

For example, inorganic or organic sources of nitrogen, such as the peptone, the meat extract, the corn, the steep liquor, the cottonseed flour, the peanut flour, the soybean meal, the yeast extract, NZ -amine, casein hydrolyzate, fish meal, a sodium nitrate, ammonium nitrate, etc. which are marketed, sources of a carbon, such as carbohydrates, such as the treacle, the starch, the dextrin, the cane sugar, a glucose, maltose, a fructose, a rhamnose, glycerol, etc. which are marketed, or a fat, can be used.

#### [0024]

Moreover, as a metallic salt, a sulfate, hydrochloride, nitrate, a phosphate, carbonate, etc., such as Na, K, Mg, Ca, Zn, and Fe, are added as required.

Besides valine, a leucine, isoleucine, a threonine, phenylalanine, tryptophan, methionine, a lysine, arginine, cysteine, cystine, etc. further as required, usually, the amino acids known, a methyl oleate, lard oil, silicone fat, a surfactant, etc.

The novel bioactive-substance (novel target compound) generation promoting agent or antifoamer of this invention is used suitably.

An any one can be used, if this producing microbe utilizes and it is useful to production of the novel bioactive substance (novel target compound) of this invention also except these things, a solid culture or liquid culture is also good for the culture method.

でも使用することができ、その培養方法は固体培養でも液体培養でもよい。

**【0025】**

液体培養の場合は静置培養、攪拌培養、振盪培養等のいずれを実施してもよいが、特に通気攪拌培養が好ましい。また、培養温度は生産菌が発育し、本発明の化合物を生産する温度、すなわち15℃～37℃の範囲で適宜変更出来るが、およそ27℃が好ましい。培地のpHは4～9の範囲で適宜変更できるが、pH6～8が好ましい。培養時間は種々の条件によって異なり、10時間～72時間であるが、通常24時間～48時間程度で培養物中に蓄積される目的化合物が最高力価に達する。培養物から目的化合物を採取するには、微生物の生産する代謝産物に用いる通常の抽出、分離、精製の手段が適宜利用される。培養物中の目的化合物は培養物をそのままか、又は遠心分離により得られた培養上清あるいは培養物に濾過助剤を加え濾過して得られた培養濾液に、酢酸エチル、クロロホルム、ベンゼン、トルエン等の水と混和しない有機溶媒を加えて抽出する。

**【0026】**

また、培養上清または培養濾液を適宜の担体に接触させ、上清又は濾液中の目的化合物を吸着させ、次いで適当な溶媒で溶出する事により目的化合物を抽出する事ができる。更に詳しく述べるならば、例えばアンバーラ

**[0025]**

In the case of liquid culture, any, such as stationary culture, a spinner culture, and a shaking culture, may be implemented, but especially aeration-rotation culture is preferable.

Moreover, culture temperature is temperature which a producing microbe grows and produces the compound of this invention, that is, although it can alter suitably in the range of 15 degrees-Celsius-37 degrees-Celsius, about 27 degrees-Celsius is preferable.

pH6-8 is preferable although pH of culture medium can be suitably altered in 4-9.

Although a culture time changes with various conditions and it is 10 hour-72 hours, usually, the target compound stored into a culture about 24 hour-48 hour reaches the highest potency.

In order to collect a target compound from a culture, means of extraction, usual separation, and a usual purification to use for the metabolite which microorganisms produce is utilized suitably.

The target compound in a culture, the organic solvents with which it does not mix with water, such as an ethyl acetate, chloroform, benzene, and toluene, are added to a culture as it is, or the culture supernatant liquid obtained by the centrifugation, or the culture filtrate obtained by adding and filtering a filter aid to a culture, and extracted.

**[0026]**

Moreover, a target compound can be extracted by making a culture supernatant liquid or a culture filtrate contact a proper support, absorbing the target compound in a supernatant liquid or a filtrate, and eluting with a then suitable solvent.

If it states in more detail, for example, the porous adsorption resin like Amberlite XAD-2,

イトXAD-2, ダイヤイオン HP 20, ダイヤイオン CHP 20P または ダイヤイオン SP 900 のごとき多孔性吸着樹脂に接触させて目的化合物を吸着させる。ついでメタノール, エタノール, アセトン, アセトニトリル等の有機溶剤と水の混合液を用いて目的物を溶出させる。この時の溶媒の混合比は, 目的化合物が最も効率よく溶出しうる値にすることはいうまでもない。すなわち溶媒比率を低濃度より段階的, または連続的に高濃度まで上げて行くことにより, 目的化合物の含まれる比率の, より高い画分を得ることが出来る。

**【0027】**

酢酸エチル, クロロホルム等の有機溶媒で抽出する場合には, 培養上清または培養濾液にこれらの溶媒を加え, よく振盪し, 目的化合物を抽出する。つぎに上記の各操作法を用いて得られた目的化合物含有画分は常用の吸着担体, 例えば活性炭, アルミナ, シリカゲル, セルロース等を担体に用いたカラムクロマトグラフィーや, シリカゲル系 ODS 逆相担体のカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー等の常法により, 更に純粋に分離精製することができる。

**【0028】****【実施例】**

以下, 実施例により, 本発明の新規生理活性物質 (新規目的化

Diaion HP 20, Diaion CHP20P, or Diaion SP 900 will be made to contact, and a target compound will be absorbed.

Subsequently, an objective substance is eluted using the liquid mixture of organic solvents, such as methanol, ethanol, acetone, and acetonitrile, and water.

It cannot be overemphasized that the mix ratio of the solvent at this time is made into the value which a target compound may elute most efficiently.

Namely, by raising a solvent ratio from low concentration to a high concentration in steps or continuously, a fraction with the higher ratio in which a target compound is contained can be obtained.

**[0027]**

In extracting by organic solvents, such as an ethyl acetate and chloroform, these solvent are added to a culture supernatant liquid or a culture filtrate, and it shakes well, and extracts a target compound.

Next, the target-compound containing fraction obtained by using each of said operating method can be separate-and-refined still more purely by conventional methods, such as column chromatography which used the adsorption support in ordinary use, for example, activated carbon, the alumina, the silica gel, the cellulose, etc. for the support, and a high performance liquid chromatography using the column of a silica-gel type ODS negative phase support.

**[0028]****[Example]**

Hereafter, an Example demonstrates in greater detail about the manufacturing method of the novel bioactive substance (novel target

合物)の製造法について更に詳細に説明する。なお、実施例の文章中、Q17897-A、Q17897-B及びQ17897-H2-1の夫々の記載は実施例により得られた本発明化合物名を意味し、本発明の微生物の菌株名をもとに命名したものである。

## 【0029】

## 実施例

グルコース1%、トリプトース(DIFCO LABORATORIES社製)0.2%、イーストエキストラクト(DIFCO LABORATORIES社製)0.1%、肉エキス(極東製薬工業社製)0.1%を含む培地(pH7.0)を作成し、この培地を500ml三角フラスコに各100mlずつ分注して、121℃で20分間滅菌した。この培地に、元スラントよりQ17897株の菌糸をかき取って接種し、毎分210回転の振とう培養を27℃で3日間行い種培養液とした。次に、ポリペプトン(大五栄養社製)1%、ドライイースト(DIFCO LABORATORIES社製)0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%、 $CaCl_2$  0.038%を含む培地(pH7.2)を5l作成し、この培地を500ml三角フラスコに各100mlずつ分注し、121℃で20分間滅菌したものに、種培養液を2%の割合で植菌し、毎分210回転の振とう培養を27℃で3日間行った。このようにして得られた培養液を毎分5

compound) of this invention.

In addition, each description of Q17897-A, Q17897-B, and Q17897-H2 -1 means this invention compound name acquired according to the Example in the text of an Example, it named based on the microbial strain name of the microorganisms of this invention.

## 【0029】

## Example

The culture medium (pH7.0) containing glucose 1%, tryptose (made by DIFCO LABORATORIES) 0.2%, yeast extract (made by DIFCO LABORATORIES) 0.1%, and 0.1 % (Kyokuto-Seiyaku-Kogyo-Inc. company make) of meat extracts was created, it dispensed each 100 ml of this culture medium to each 500 ml Erlenmeyer flask, and sterilized for 20 minutes at 121 degrees-Celsius.

To this culture medium, from the former slant, the Q17897 strain hypha was raked, and was inoculated, the shaking culture of per minute 210 rotation was performed for three days at 27 degrees-Celsius, and it considered as the starter-culture liquid.

Next, 5l. (pH7.2) of culture mediums containing polypeptone (made by Daigo-Eiyo) 1% and dry yeast (made by DIFCO LABORATORIES) 0.1% and  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05% and  $CaCl_2$  0.038% is created, to what dispensed each 100 ml of this culture medium to each 500 ml Erlenmeyer flask, and sterilized for 20 minutes at 121 degrees-Celsius, the starter-culture liquid was inoculated at 2% of a ratio, the shaking culture of per minute 210 rotation was performed for three days at 27 degrees-Celsius.

Thus, per minute 5000 rotation was centrifuged for 20 minutes to the obtained culture solution.

5l. of obtained culture supernatant liquids was adjusted to pH7 with 1N hydrochloric acid, the same amount ethyl acetate performed extraction twice, and 470 mg of rough active fractions was obtained.

This rough active fraction was dissolved in a

000回転の遠心分離を20分間行い、得られた培養上清液5 lを1 N塩酸でpH7に調整し、同量の酢酸エチルで2回抽出を行い、粗活性画分470 mgを得た。この粗活性画分を少量のクロロホルムに溶解させた。次いで、クロロホルムで充填したワコーゲルC200（和光純薬社製）（2 i. d. × 19 cm）のカラムに、クロロホルムに溶解させた粗活性画分を乗せ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。1フラクションを5 mlとして分画し、移動相をクロロホルム（159 ml）、クロロホルム-メタノール/98:2（300 ml）、19:1（600 ml）、4:1（250 ml）と順次変化させたところ、クロロホルム-メタノール/19:1で溶出したフラクション101から114よりQ17897-Bを含む活性画分30 mgを、フラクション115から167よりQ17897-AおよびQ17897-H2-1を含む活性画分57 mgを得た。このうち、Q17897-A及びQ17897-H2-1を含む活性画分を少量のメタノールに溶解させ、分取高速液体クロマトグラフィー [カラム: STR-ODS-H 10 i. d. × 250 mm（島津社製）、検出: UV 215 nm、移動相: 33%アセトニトリル、流速: 5 ml/min.] により精製した。保持時間14~16分で単一ピークを示す画分を集めて濃縮後、酢酸エチルで抽出した。得られた酢酸エチル層を

small amount of chloroform.

Subsequently, the rough active fraction which chloroform was made to dissolve in the column of the Wako gel C200 (Made by Wako Purechemical KK) (2i.d.\*19cm) filled with chloroform was put, and silica-gel column chromatography was performed.

One fraction was fractionated as 5 ml and the mobile phase was changed to chloroform (159 ml) and chloroform-methanol / 98:2 (300 ml), 19:1 (600 ml) and 4:1 (250 ml) in order.

30 mg of active fractions which contain Q17897-B from the fractions 101-114 which eluted by chloroform-methanol / 19:1, 57 mg of active fractions which contain Q17897-A and Q17897-H2 -1 from fractions 115-167 was obtained.

Among these, the active fraction containing Q17897-A and Q17897-H2 -1 is dissolved in a small amount of methanol, it purified by aliquoting high-performance-liquid-chromatography [column: STR-ODS-H10i.d.x250 mm (Made by Shimadzu company), detection:UV215 nm, mobile-phase:33-% acetonitrile, and flow-rate:5-ml/min.]

The ethyl acetate extracted, after collecting and concentrating the fraction which shows a single peak in holding-time 14-16 minutes.

By concentration-drying the obtained ethyl-acetate layer, it was obtained 8 mg, having used Q17897-H2 -1 as the white powder.

Similarly the fractions which show a single peak in holding-time 19-21 minutes were collected, and the ethyl acetate extracted after concentration.

By concentration-drying the obtained ethyl-acetate layer, it was obtained 17 mg, having used Q17897-A as the white powder.

Furthermore, the aliquoting high performance liquid chromatography purified the active fraction containing Q17897-B on said conditions, the ethyl acetate extracted, after collecting and concentrating the fraction which shows a single peak in holding-time 23-25 minutes.

By concentration-drying the obtained ethyl-

濃縮乾固することにより、Q 1 7 8 9 7-H 2-1 を白色粉末として 8 m g 得た。同様に、保持時間 1 9 ~ 2 1 分で単一ピークを示す画分を集めて濃縮後、酢酸エチルで抽出した。得られた酢酸エチル層を濃縮乾固することにより、Q 1 7 8 9 7-A を白色粉末として 1 7 m g 得た。さらに、Q 1 7 8 9 7-B を含む活性画分を上記条件で分離高速液体クロマトグラフィーにより精製し、保持時間 2 3 ~ 2 5 分で単一ピークを示す画分を集めて濃縮後、酢酸エチルで抽出した。得られた酢酸エチル層を濃縮乾固することにより、Q 1 7 8 9 7-B を白色粉末として 1 1 m g 得た。上記抽出、分離、精製された化合物である Q 1 7 8 9 7-A、Q-1 7 8 9 7-B 及び Q 1 7 8 9 7-H 2-1 は、夫々、下記の物理化学的性質及び化学構造式を示すことが確認された。

## 【0030】

(1) Q 1 7 8 9 7-A

分子量：934 (分子量は F A B-M A S S によって決定した。)

分子式： $C_{46}H_{62}N_8O_{13}$

紫外吸収スペクトル：末端吸収

赤外線吸収スペクトル：K B r 法による赤外線吸収スペクトルは、第 1 図のとおりである。

$^1H$ -NMR スペクトル：D M S O-d<sub>6</sub> を溶媒とする 5 0 0 M H z の  $^1H$ -NMR スペクトルは、第 2 図のとおりである。

$^{13}C$ -NMR スペクトル：D M

acetate layer, it was obtained 11 mg, having used Q17897-B as the white powder.

It was confirmed that Q17897-A, Q-17897-B, and Q17897-H2-1 which is said compound extracted, separated and purified shows the below-mentioned physicochemical characteristic and chemical structure, respectively.

## [0030]

(1) Q17897-A

Molecular weight: 934 (FAB-MASS determined molecular weight.)

Molecule formula: C<sub>46</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>

Ultra-violet absorption spectrum: Powder end absorption

Infrared absorption spectrum: The infrared absorption spectrum by KBr method is as a Figure 1.

$^1H$ -NMR spectrum: 500 MHz  $^1H$ -NMR spectrum which uses DMSO-d<sub>6</sub> as a solvent is as a Figure 2.

$^{13}C$ -NMR spectrum: The 125 MHz  $^{13}C$ -NMR spectrum which uses DMSO-d<sub>6</sub> as a solvent is as a Figure 3.

Specific rotation:  $[(\alpha)]_D^{25}$ -10.1 degrees (c=0.2, acetonitrile)



SO-d<sub>6</sub>を溶媒とする125 MHzの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは、第3図のとおりである。

比旋光度:  $[\alpha]_D^{25} - 10.1^\circ$

(c = 0.2, アセトニトリル)

上記の理化学的性状からQ17897-Aの化学構造は下式のものが示唆される。

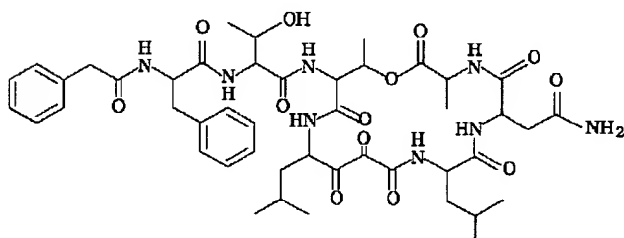
As for the chemical constitution of Q17897-A, the following expression is suggested from said physicochemical characteristic.

【0031】

[0031]

【化5】

[COMPOUND 5]



【0032】

(2) Q17897-B

分子量: 586 (分子量はFAB-MASSによって決定した。)

分子式: C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>

紫外吸収スペクトル: 220 nm ( $\epsilon = 47000$ ), 281 nm ( $\epsilon = 7100$ ), 290 nm ( $\epsilon = 5900$ )

赤外線吸収スペクトル: KBr法による赤外線吸収スペクトルは、第4図のとおりである。

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル: CD<sub>3</sub>ODを溶媒とする500 MHzの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、第5図のとおりである。

[0032]

(2)Q17897-B

Molecular weight: 586 (FAB-MASS determined molecular weight.)

Molecule formula: C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>

Ultra-violet absorption spectrum: 220 nm (epsilon) (= 47000), 281 nm (epsilon) (= 7100), 290 nm (epsilon) (= 5900)

Infrared absorption spectrum: The infrared absorption spectrum by KBr method is as in a 4th figure.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum: 500 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum which uses CD<sub>3</sub>OD as a solvent is as in a 5th figure.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum: The 125 MHz <sup>13</sup>C-NMR spectrum which uses DMSO-d<sub>6</sub> as a solvent is as in a 6th figure.

Specific rotation:  $[(\alpha)]_D^{25} - 85.0$  degrees (c = 0.5, acetonitrile)

$^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル: DM  
 $\text{SO}-d_6$  を溶媒とする 125  
 MHz の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル  
 は、第6図のとおりである。  
 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25} - 85.0^\circ$   
 ( $c = 0.5$ , アセトニトリル)  
 上記の理化学的性状から Q17  
 897-B の化学構造は下式の  
 ものが示唆される。

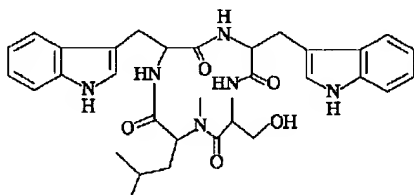
As for the chemical constitution of Q17897-B,  
 the following expression is suggested from said  
 physicochemical characteristic.

【0033】

[0033]

【化6】

[COMPOUND 6]



【0034】

(3) Q17897-H2-1  
 分子量: 900 (分子量は F A  
 B - M A S S によって決定し  
 た。)  
 分子式:  $\text{C}_{43}\text{H}_{64}\text{N}_8\text{O}_{13}$   
 紫外外部吸収スペクトル: 末端吸  
 収  
 赤外線吸収スペクトル: K B r  
 法による赤外線吸収スペクトル  
 は、第7図のとおりである。  
 $^1\text{H}$ -NMR スペクトル: DM  
 $\text{SO}-d_6$  を溶媒とする 500  
 MHz の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル  
 は、第8図のとおりである。  
 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル: DM  
 $\text{SO}-d_6$  を溶媒とする 125

[0034]

(3)Q17897-H2-1  
 Molecular weight: 900 (FAB-MASS determined  
 molecular weight.)  
 Molecule formula:  $\text{C}_{43}\text{H}_{64}\text{N}_8\text{O}_{13}$   
 Ultra-violet absorption spectrum: Powder end  
 absorption  
 Infrared absorption spectrum: The infrared  
 absorption spectrum by KBr method is as in a  
 7th figure.  
 $^1\text{H}$ -NMR spectrum: 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR  
 spectrum which uses  $\text{DMSO}-d_6$  as a solvent is  
 as in a 8th figure.  
 $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum: The 125 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR  
 spectrum which uses  $\text{DMSO}-d_6$  as a solvent is  
 as in a 9th figure.  
 Specific rotation:  $[(\alpha)]_D^{25} - 1.8$  degrees ( $c =$   
 0.5, acetonitrile)  
 As for the chemical constitution of Q17897-H2 -

MHz の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルは、第 9 図のとおりである。

比旋光度:  $[\alpha]_D^{25} - 1.8^\circ$

( $c = 0.5$ , アセトニトリル)

上記の理化学的性状から Q17897-H2-1 の化学構造は下式のものが示唆される。

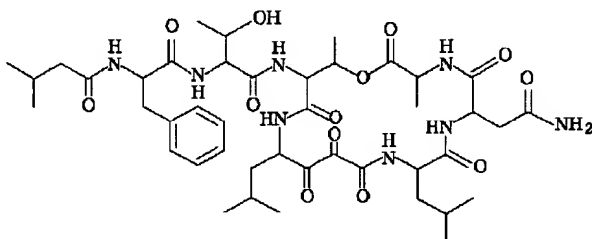
1, the following expression is suggested from said physicochemical characteristic.

【0035】

[0035]

【化 7】

[COMPOUND 7]



【0036】

本発明化合物中、上記 Q17897-A 及び Q17897-H2-1 は、下記部分構造 (A) のトリケト構造を有する点にも特徴がある。

[0036]

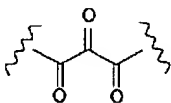
Said Q17897-A and Q17897-H2-1 have the characteristics also in the point of having the tri keto structure of following partial structure (A), among this invention compound.

【0037】

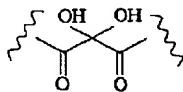
[0037]

【化 8】

[COMPOUND 8]



(A)



(B)

**【0038】**

しかしながら、トリケト構造 (A) を有する化合物は、水分子が付加結合した部分構造 (B) のジケトジオール構造を有する化合物 (以下便宜上水和物と称する) の方が熱力学的に安定であるため、水が存在する状態においては、その一部または全部がその水和物に変化するものと予想される。事実、本発明化合物 Q17897-A 又は Q17897-H2-1 の理化学的データは、トリケト構造 (A) を支持する一方で、<sup>1</sup>H-NMR データにおいては、水和物の 2 個のプロトンに対応するピークが化学シフト 7.4 ppm 付近に検出され、さらに <sup>13</sup>C-NMR においても 95 ppm 付近に水和物由来のピークが検出されることから、水和物の存在が確認された。

**【0039】**

このことは、その NMR 測定の際、空気中あるいは DMSO-d<sub>6</sub> 中に存在した微量の水分と結合して水和物を形成したことによるものと考えられる。従って、本明細書特許請求の範囲や詳細な説明において、本発明化合物 Q17897-A 及び Q17897-H2-1 はトリケト構造だけに限定されず、それらの水和物をも含むものと解釈されるべきである。

**【0040】****[0038]**

However, as for the compound which has tri keto structure (A), the compound (a hydrate is called for convenience below) which has the diketo diol structure of partial structure (B) in which the water molecule carried out the addition bonding is thermodynamically more stable.

Therefore, in the state in which water exists, it estimates that the one part or all changes to the hydrate.

In fact, while the physicochemical data of this invention compound Q17897-A or Q17897-H2-1 support tri keto structure (A), in <sup>1</sup>H-NMR data, the peak corresponding to the 2-piece proton of a hydrate is detected near 7.4 ppm of chemical shifts, furthermore, since the peak was detected derived from the hydrate near 95 ppm also in <sup>13</sup>C-NMR, the presence of a hydrate was confirmed.

**[0039]**

This is considered to be because it to have bonded with the trace amount moisture content which existed in air or DMSO-d<sub>6</sub> at the time of the NMR measurement and for the hydrate to have been formed.

Therefore, in this specification claim or detailed description, this invention compound Q17897-A and Q17897-H2-1 should not be limited only to tri keto structure, but should be interpreted as the thing also containing those hydrates.

**[0040]**

**【発明の効果】**

本発明化合物は、ヒト白血球由来のエラスターゼに対する優れた阻害作用を示すことから、肺疾患(特に肺気腫及びARDS)やリウマチ様関節炎、気管支炎、骨関節炎、脊椎炎、狼瘡、乾癬等のような炎症症状の治療又は予防に有用である。

**【0041】**

本発明化合物の優れたエラスターゼ阻害作用は、以下の方法により確認された。

(エラスターゼ阻害活性測定法) ヒト好中球エラスターゼを用いて、Schuessler らの方法

(Hoppe-Seyler'sZ. Physiol. Chem. 358, 53(1977))を基本としたわずかな変法により行った。すなわち、好中球エラスターゼに比較的特異性の高い合成基質 [サクシニル-アラニル-アラニル-アラニル-p-ニトロロアニリド (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA)] (ペプチド研究所製)を用いた比色法により測定した。

0.2Mトリエタノールアミン-塩酸緩衝液(pH 7.8)の624 $\mu$ lにヒト好中球エラスターゼ(アテンズ・リサーチ・アンド・テクノロジー・インコーポレーション社製)(100 $\mu$ g/ml・0.001N塩酸)の33 $\mu$ lと測定検体溶液10 $\mu$ lを加えて、25℃で10分間インキュベートした後、Suc-Ala-Ala-Ala-pNA液(1.35mg/ml上記緩衝液)の333 $\mu$ lを加えて1mlとして、さらに20分間インキュベ

**[EFFECT OF THE INVENTION]**

Since this invention compound shows the excellent inhibitory effect with respect to an elastase derived from a human leucocyte, it is useful to the treatment or prevention of pulmonary disorders (especially pulmonary emphysema and ARDS), the rheumatism arthritis, a bronchitis, an osteoarthritis, the spondylitis, the lupus, psoriasis, etc. of the inflammation symptom.

**[0041]**

The excellent elastase inhibitory effect of this invention compound was confirmed by the following method.

(Elastase inhibitory-activity measuring method)

The human neutrophil elastase was used and it carried out by few modified methods based on Schuessler's and others method (Hoppe-Seyler'sZ. Physiol. Chem. 358, 53 (1977)).

That is, it measured with the colorimetric method which used a synthetic substrate with comparatively high specificity [succinyl-alanyl-alanyl-alanyl-p-nitro anilide (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA)] (made by Peptide Institute. Inc.) for the neutrophil elastase.

To 624 microliter of 0.2M triethanolamine-hydrochloric acid buffer (pH 7.8), 33 microliter of a human neutrophil elastase (Made by Athens Research and Technology Incorporation) (100 microgram/ml 0.001N hydrochloric acid), and measure regular-inspection object solution 10 microliter are added.

After carrying out 10 minutes incubation at 25 degrees-Celsius, 333 microliter(s) of a Suc-Ala-Ala-Ala-pNA liquid (1.35 mg/ml said buffer) were added, and 1 ml was as incubated for 20 more minutes.

After adding 10 microliter of a phenylmethyl sulfonyl fluoride (0.1M) to a reaction solution and stopping reaction, free p-nitro anilide was measured with the absorbance of 405 nm, and the inhibition rate was calculated by following Formula.

Inhibition percentage (%) =  $[1 - (\text{test-substance value} - \text{blank value}) / (\text{control value} - \text{blank value})]$

ートした。反応液にフェニルメ <sup>\*100</sup>

チルスルホニルフルオリド

(0.1M) の10  $\mu$  lを加えて反応を停止した後、遊離したp-ニトロアニリドを405 nmの吸光度で測定し、次式によって阻害率を求めた。

阻害率 (%) = [1 - (検体値 - ブランク値) / (コントロール値 - ブランク値)] × 100

#### 【0042】

上記方法により算出したQ17897-Aのエラスターゼ阻害活性のIC<sub>50</sub>値は6.7 × 10<sup>-8</sup>Mであった。

#### [0042]

IC<sub>50</sub> value of the elastase inhibitory activity of Q17897-A computed by said method was 6.7\*10<sup>-8</sup>M.

#### 【0043】

本発明化合物(I), (II) またはそれらの塩を主成分として有する薬剤組生物は、当分野において通常用いられている製剤用担体、賦形剤等を用いて、通常使用されている方法によって調製することができる。投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与、あるいは静注、筋注等の注射剤、坐剤等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。投与量は投与する対象、投与ルートなどによって変動するが、通常0.1~200 mg/kg/日、好ましくは1~100 mg/kg/日である。

#### [0043]

This invention compound (I), (II), or the chemical-agent group organism which has those salts as a main component can be prepared by the method currently used normally using a support for a formulation, an filler, etc. which are normally used in this specialty.

Medication is oral administration by a tablet, the pill, the capsule, the granule, the powder, a liquid agent, etc., or the parenteral administration by injections, such as an intravenous administration and an intramuscular injection, a suppository, etc.

Any form is sufficient.

A dosage is a 0.1 to 200-mg/kg /day normally, although it fluctuates by an object, a medication route, etc. which are administered for the patient, preferably it is a 1 to 100-mg/kg /day.

#### 【図面の簡単な説明】

#### [BRIEF EXPLANATION OF DRAWINGS]

#### 【図1】

Q17897-Aの赤外線吸収スペクトルを示す。

#### [FIGURE 1]

The infrared absorption spectrum of Q17897-A is shown.

**【図 2】**

Q 1 7 8 9 7 - A の  $^1\text{H}$ -NMR  
R スペクトルを示す。

**[FIGURE 2]**

1 H-NMR spectrum of Q17897-A is shown.

**【図 3】**

Q 1 7 8 9 7 - A の  $^{13}\text{C}$ -NMR  
R スペクトルを示す。

**[FIGURE 3]**

The  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of Q17897-A is shown.

**【図 4】**

Q 1 7 8 9 7 - B の赤外線吸収  
スペクトルを示す。

**[FIGURE 4]**

The infrared absorption spectrum of Q17897-B is shown.

**【図 5】**

Q 1 7 8 9 7 - B の  $^1\text{H}$ -NMR  
R スペクトルを示す。

**[FIGURE 5]**

1 H-NMR spectrum of Q17897-B is shown.

**【図 6】**

Q 1 7 8 9 7 - B の  $^{13}\text{C}$ -NMR  
R スペクトルを示す。

**[FIGURE 6]**

The  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of Q17897-B is shown.

**【図 7】**

Q 1 7 8 9 7 - H 2 - 1 の赤外  
線吸収スペクトルを示す。

**[FIGURE 7]**

The infrared absorption spectrum of Q17897-H2 -1 is shown.

**【図 8】**

Q 1 7 8 9 7 - H 2 - 1 の  $^1\text{H}$ -  
NMR スペクトルを示す。

**[FIGURE 8]**

1 H-NMR spectrum of Q17897-H2 -1 is shown.

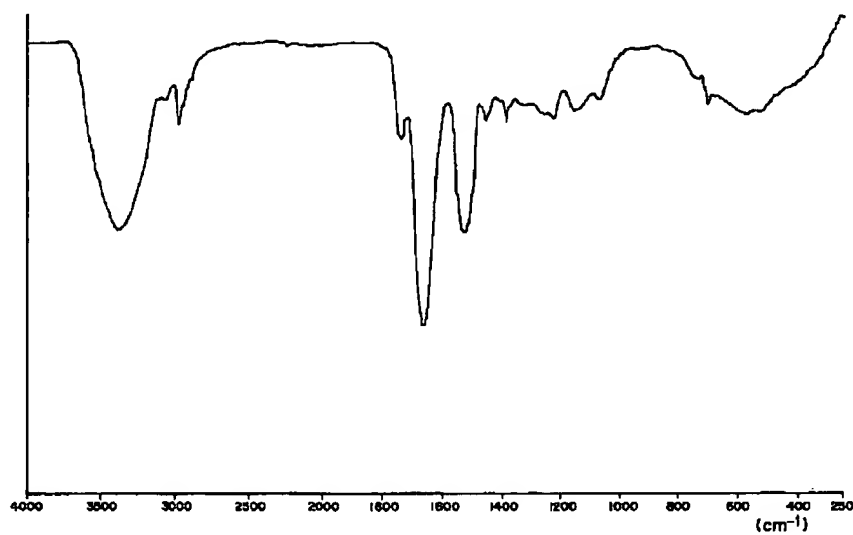
**【図 9】**

Q 1 7 8 9 7 - H 2 - 1 の  $^{13}\text{C}$ -  
NMR スペクトルを示す。

**[FIGURE 9]**

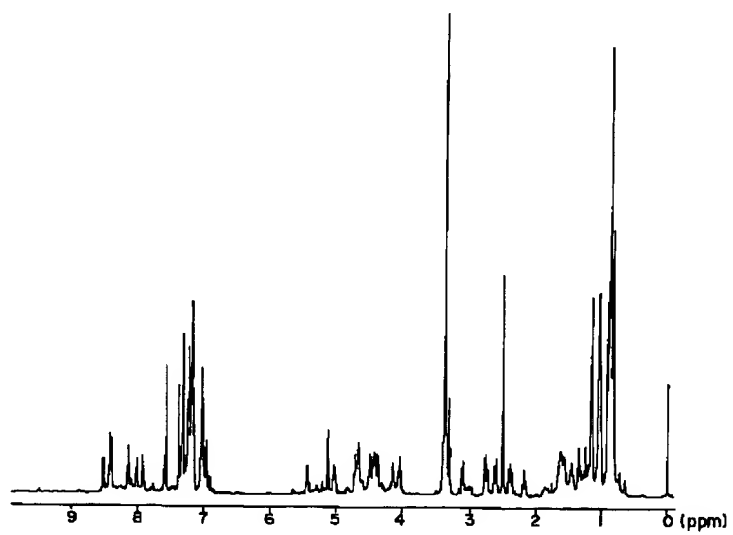
The  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of Q17897-H2 -1 is shown.

**【図 1】****[FIGURE 1]**



【図 2】

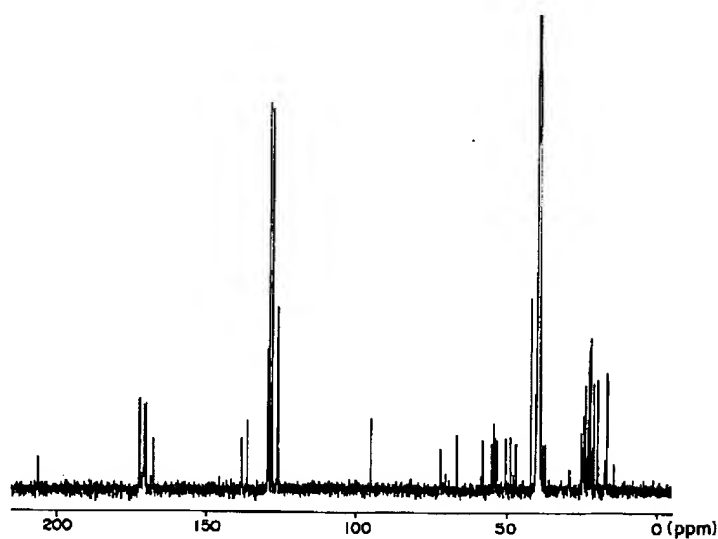
[FIGURE 2]



【図 3】

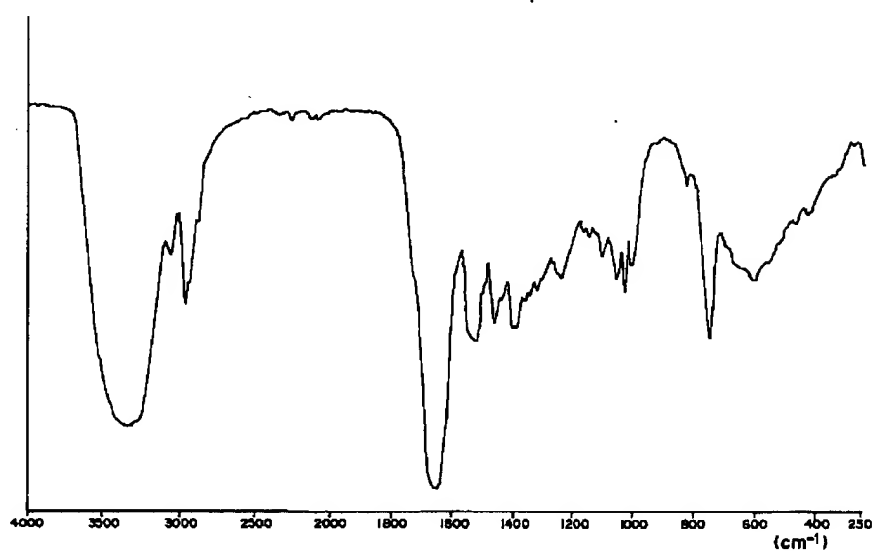
[FIGURE 3]





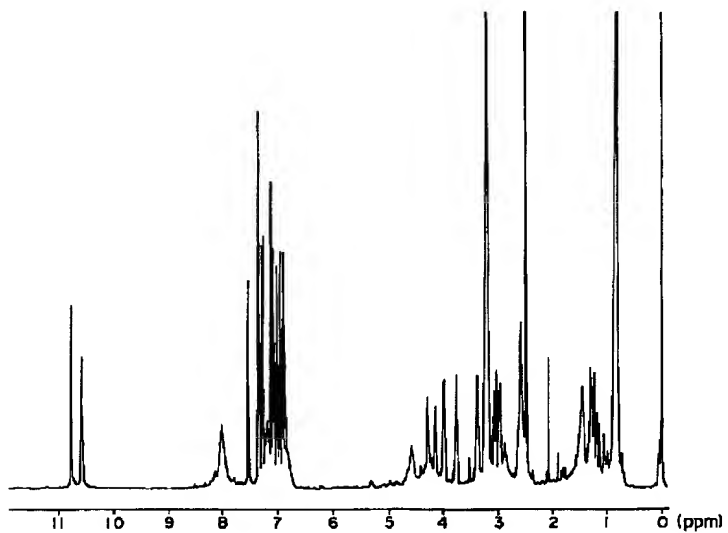
【図 4】

[FIGURE 4]



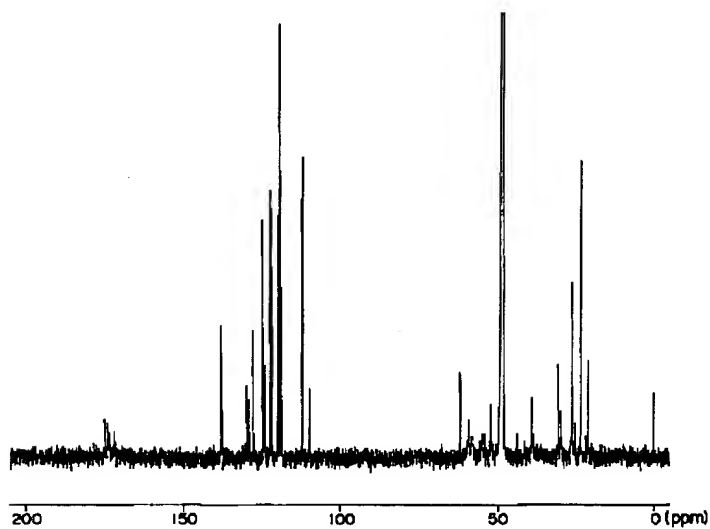
【図 5】

[FIGURE 5]



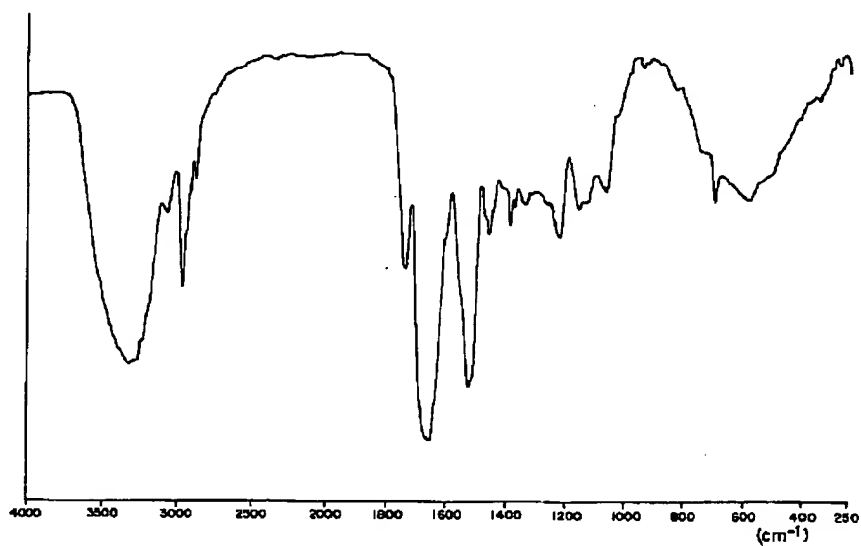
【図 6】

[FIGURE 6]



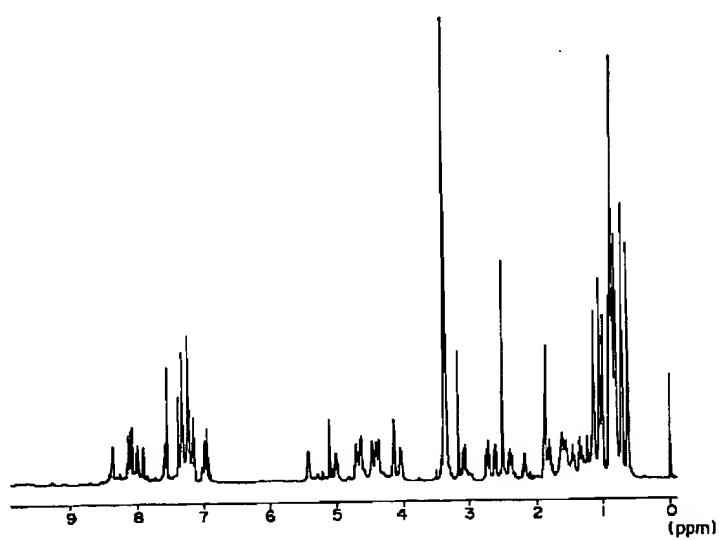
【図 7】


[FIGURE 7]



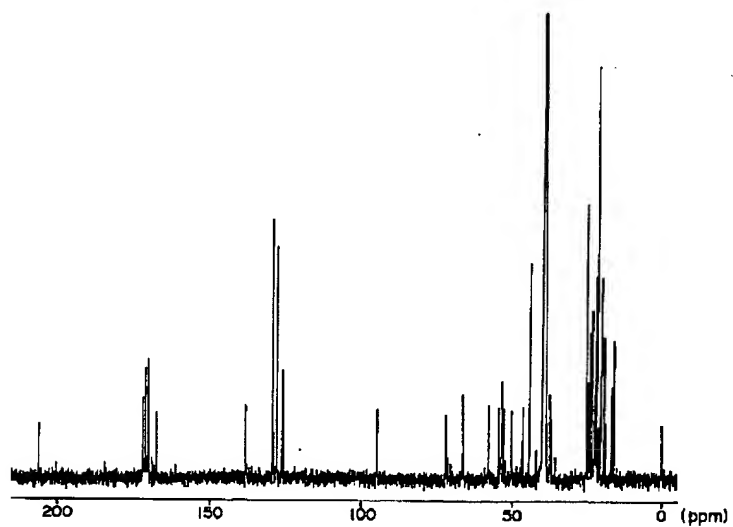
【図 8】

[FIGURE 8]



【 9】

[FIGURE 9]





## **DERWENT TERMS AND CONDITIONS**

*Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)